



TITLE:

京都大学再生医科学研究所年報 2006

AUTHOR(S):

CITATION:

京都大学再生医科学研究所年報 2006. 京都大学再生医科学研究所年報
2007, 9

ISSUE DATE:

2007-03-25

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/50579>

RIGHT:

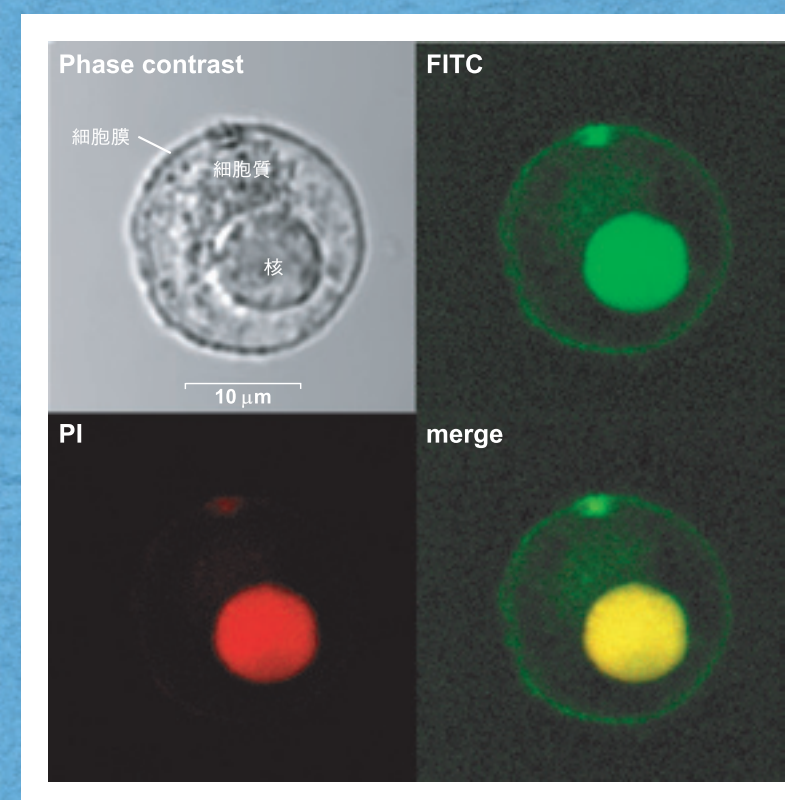
京都大学

再生医科学研究所年報（第九卷）

二〇〇六

京都大学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University

〈第 9 卷〉

2006
平成18年

表紙写真

緑茶ポリフェノール(エピガロカテキンガレート, EGCG)のマウス皮膚線維芽細胞(L929)への取り込みの様子を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。浮遊状態のL929に対して100 μ MのFITCラベルしたEGCGで処理した時の位相差顕微鏡像(左上), FITC蛍光像(右上), ヨウ化プロビジウム(PI)による核染色像(左下), FITC・PI二重染色像(右下)。FITCラベルしたEGCGが1時間後で既に細胞膜のみならず, 核にも移行し吸着されていることが確認できる。

目 次

1. 巻頭言	1
2. 京都大学再生医科学研究所概要	
2-1 沿革	2
2-2 教員数等	2
(1) 教員	2
(2) 大学院生・研修員・研究生等	2
2-3 組織図	3
3. 研究概要と研究業績	
生体機能学研究部門	
細胞機能調節学分野	4
生体微細構造学分野	11
生体機能調節学分野	13
生体システム制御学分野	19
生体再建学分野	23・24
生体組織工学研究部門	
生体分子設計学分野	26
生体材料学分野	32
組織修復材料学分野	61
生体物性学分野	68
再生統御学研究部門	
発生分化研究分野	69
再生誘導研究分野	73
再生増殖制御学分野	79
再生免疫学分野	83
再生医学応用研究部門	
組織再生応用分野	87
器官形成応用分野	92
臓器再建応用分野	96
附属再生実験動物施設	104
附属幹細胞医学研究センター	
霊長類胚性幹細胞研究領域	108
幹細胞分化制御研究領域	113
幹細胞加工研究領域	118
細胞プロセッシング研究領域	123
再プログラム化研究領域	124
附属ナノ再生医工学研究センター	
ナノバイオプロセス研究領域	127
シミュレーション医工学研究領域	134
ナノバイオメカニズム研究領域	144
寄附研究部門	
組織分化制御学研究部門	147
技術部	151
4. ナノメディシン融合教育ユニット	152
5. 学術集会	
5-1(1) Joint Forum	153
5-1(2) 再生医科学研究所学術講演会	155
5-2 セミナー	156
5-3 研究発表会	159
5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会	160
6. 協議員・教職員・その他構成員名簿	161

1. 巻 頭 言

再生医科学研究所が「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的として平成 10 年 4 月に設置されてから早くも 9 年近くが経過して、まもなく 10 年の節目を迎えようとしています。この間、再生医学および再生医療に対する社会の注目と期待は国内外でますます増大すると同時に、できるだけ早く画期的な難病治療などの実現が切望されています。再生医学および医療の発展を確実に実現するためには生命科学、医学と工学を統合した学際的融合的研究が不可欠です。多様な学問分野を基盤とする研究者が共に研究を押し進める再生医科学研究所は、その中核的役割を果たすことを目指して、最大限の努力を続けることが私どもの責務であると考えています。

平成 18 年には、文部科学省の特別教育研究経費「再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターにおける、新たな ES 細胞(臨床応用用 ES 細胞)樹立のプロジェクト研究」によって、ヒト ES 細胞用セルプロセッシングセンターの施設整備が完了し、数年後の本格稼働を目指した研究と検討作業を進める予定です。

研究所の人事異動としては、附属ナノ再生医工学研究センターナノバイオメカニズム研究領域の池内健教授が平成 18 年 3 月に定年退職されました。平成 18 年 4 月に生体組織工学研究部門生体物性学分野に山本伸子客員教授、生体機能学研究部門生体再建学分野には清木(古谷)誠客員助教授、そして平成 18 年 10 月には附属幹細胞医学研究センター再プログラム化研究領域に鳥居隆三客員教授が新たに就任されました。新たな採用はありませんでした。

平成 16 年 4 月の法人化から 3 年経過した国立大学は、厳しい国家財政と政府予算が続く中で、今後社会の中でどのような大学を目指すべきかを探りつつあります。私どもの再生医科学研究所は再生医学の基礎と応用研究という明確なミッションをもつ研究所であることを基本線として、真に社会に貢献したと評価される研究所になりたいと考えています。引き続き皆様のご支援とご助言を宜しくお願い申し上げます。

平成 19 年 1 月

所 長 中 辻 憲 夫

2. 京都大学再生医科学研究所概要

2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げて来た生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が設置され、よって、現在4大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用)、3附属施設、1寄附研究部門となっている。平成17年10月には、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は生命科学、医学、工学などの研究者が結集して再生医学の学際的基礎研究を押し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の国内唯一の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、文部科学大臣が確認したヒトES細胞使用研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館(旧胸部疾患研究所附属病院の後身である医学部附属病院南西病棟と合同使用)、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、ES細胞研究棟(平成14年竣工)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年竣工)の4棟となっている。

2-2 教員数等

(1) 教員 (平成19年1月1日現在)

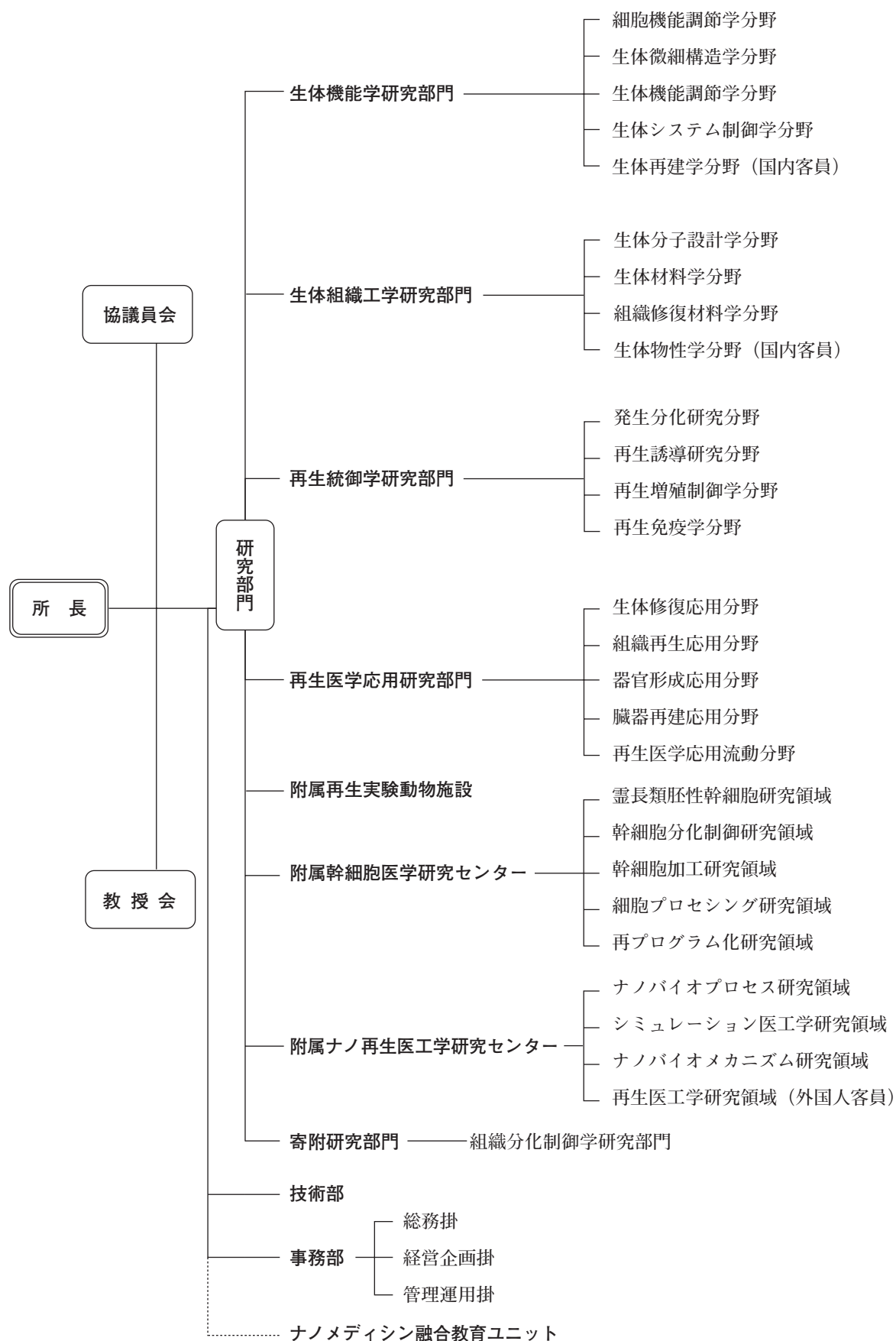
区 分	教 授	助 教 授	助 手	計
定 員	18 (2) < 1 >	19 (1)	3	40 (3) < 1 >

() は国内客員で外数
< > は外国人客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成19年1月1日現在)

大 学 院 生	研 修 員	研 究 生	外国人共同研究者等
125	6	10	5

2-3 組織図



3. 研究概要と研究業績

生体機能学研究部門

細胞機能調節学分野

Department of Molecular and Cellular Biology

分野主任 教授 永田 和宏

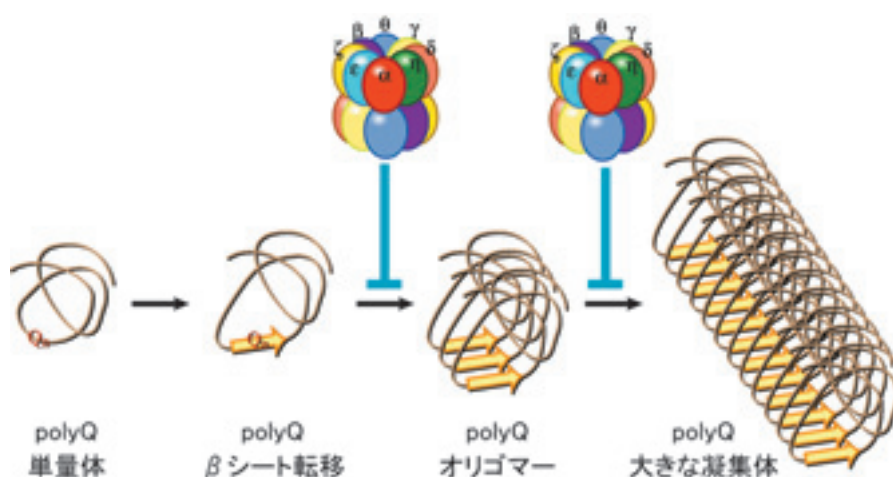
Prof. Kazuhiro Nagata

【研究概要】

細胞機能調節学分野では、分子シャペロンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の合成・再生・品質管理の機構について、以下の3つの大きなテーマに添って研究を進めてきたが、本年よりもう一つ新しいプロジェクトをスタートさせた。

第1のテーマは、小胞体における productive folding に関する研究であり、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析を中心に研究を進めている。HSP47 はコラーゲンの正常な合成・分泌にとって必須の分子シャペロンであることを明らかにしてきたが、HSP47 は組織の繊維化にとっても重要な寄与をし、HSP47 の発現を抑制することによって繊維化の進行を遅らせることができる。HSP47 ノックアウトマウス、および HSP47 ノックアウト ES 細胞や繊維芽細胞を用いた研究より、HSP47 が I 型及び IV 型コラーゲンの分子成熟(3 本鎖形成)に必須の分子シャペロンであることを明らかにし、基底膜やコラーゲン繊維の形成に必須であることを明らかにした。HSP47 ノックアウト細胞においては、I 型コラーゲンの線維形成が極めて貧弱であり、コラーゲン線維は細い、しかも枝分かれのある線維から成っていることが明らかになった。これはプロコラーゲンのプロセッシングに異常があることに由来し、実際に N プロペプチドの切断されていないコラーゲンが細胞外マトリックス中に蓄積していた。また、これら分泌遅延を起こしたプロコラーゲンは小胞体中に不溶性の凝集体として蓄積していることを示した。

(文責・永田)



CCT による polyQ 凝縮阻止のメカニズム

polyQ タンパク質は、はじめ単量体の可溶性の状態が存在するが、あるきっかけによって Q の部分が β シートに転移する。この β シートが核となって多量体化し、最終的には巨大な凝集体となる。CCT は β シート部分を認識することで、凝集体が大きくなることを防いでいる。

第2のテーマとして、小胞体品質管理(ERQC)、小胞体関連分解(ERAD)の作用機序の解明を、細胞および分子レベルで行っている。ERQC, ERAD に関しては、遺伝子レベルで *mutation* をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が疾患を引き起こすことが明らかにされ、臨床・疾病治療の面からも注目されている。ERAD に関わる EDEM ホモログタンパク質は、酵母では1種類、哺乳類では3種類あることが明らかにされた。いずれも糖タンパク質の ERAD を促進するが、その分子メカニズムは異なっているようなので、その違いを明らかにするとともに、EDEM ファミリーを包括する機能の解明を行いたいと考えている。さらに、ERQC における N 結合型糖鎖の役割、タンパク質の小胞体からの逆行輸送に関与する分子、小胞体膜上でタンパク質をユビキチン化する分子の研究も行っており、いずれも独自の視点に立った研究を進めている。(文責・細川)

第3のテーマである細胞質シャペロン CCT および関連タンパク質に関して、以下の進展があった。まず、細胞質シャペロン CCT が、インビトロにおいて、 β シートに富んだ基質タンパク質を特異的に認識し、その凝集を抑えることを見いだした。詳細な解析の結果、CCT は疎水性 β ストランドを特異的に認識し、基質タンパク質のプロダクティブ・フォールディングを促進するとともに凝集を阻止する分子シャペロンであると考えられた。そこで、ほ乳類細胞内の CCT に関して、同様の働きを示すのかについて、 β シートを介して凝集することが知られているポリグルタミンをモデル基質として解析を行った。RNAi により CCT の細胞内含量を低下させるとポリグルタミンの凝集が促進され、逆に、全サブユニットを過剰発現により CCT 量を増加させると、凝集が抑制された。さらに、蛍光相関分光法を用いた解析から、CCT 量の低下により、小さな可溶性のポリグルタミン凝集体が形成されることが明らかとなった。CCT 量の低下は同時に神経細胞死も増大させるので、CCT はポリグルタミン凝集の初期過程(オリゴマー形成)を阻止することにより細胞毒性を抑制するものと考えられる。また、CCT の過剰発現によりポリグルタミンによる神経細胞死が抑制されるので、CCT による神経変性疾患の治療の可能性が示唆される。この他に、CCT に弱い相同性をもつ MKKS タンパク質に関して、その変異体は、フォールディング異常により、品質管理ユビキチンリガーゼである CHIP を介した系で素早く分解されることがわかった。(文責・久保田)

新しくスタートした第4のテーマは、小胞体内のレドックス関連因子が小胞体における品質管理機構に重要な役割を持っているとの仮説からスタートし、EDEM に結合する分子として ERdj5 タンパク質を同定、クローニングした。ERdj5 は分子シャペロン BiP が結合する部位である J ドメインを有し、かつレドックス活性に必要な CXXC モチーフをも有している。ERdj5 は小胞体における初めての還元活性をもったレドックス因子であることを明らかにし、これが ERAD の促進に重要な影響を持っていることを明らかにしつつある。このグループは博士研究員である寶閑淳をリーダーとしたグループである。(文責・永田)

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the stress response and the regulation and function of molecular chaperone/stress proteins. We are working mainly on four topics in this field.

We found and cloned the gene of a novel stress protein HSP47 which resides in the endoplasmic reticulum (ER) acting as a collagen-specific molecular chaperone in the pathway of collagen biosynthesis, processing and secretion. HSP47 specifically and transiently binds to various types of collagen in the ER. In addition to the binding specificity to collagen, the expression of HSP47 is always closely correlated with those of collagens during the normal development of mouse embryo as well as in the pathophysiological conditions including liver and renal fibrosis.

We already succeeded in making knockout mice lacking *hsp47* gene, which resulted in causing the embryonic lethality at 10.5 dpc in *hsp47*^{-/-} homozygotic mice. In these homozygotic mice, the maturation of type I collagen was abnormal and the immature form of procollagen accumulated in the tissues. Using *hsp47*^{-/-} ES cells, we found this year

that type IV collagen secreted from hsp47-null cells could not form correct triple helices and the basement membrane was not formed in the embryoid bodies from those cells. We also observed the impairment of basement membrane formation in mouse embryos, thus these findings reveal that the knockout of a chaperone protein HSP47 causes the abnormality in molecular maturation of its substrate, and HSP47 is essential for mouse normal development. In those knockout mice, type IV collagen was observed to accumulate in the ER causing an ER stress, and apoptosis was also observed in those embryos after 10.5 dpc. (By K. Nagata)

Another project we are working on the molecular mechanism of ERQC (ER quality control) and ERAD (ER-associated degradation). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases and neurodegenerative disorders. We have previously cloned a mouse gene EDEM, which is involved in the ERAD of glycoproteins. There are three EDEM homolog proteins in mammals and one paralog in yeast. Although all of the homologs enhance glycoprotein ERAD, the molecular mechanisms of each proteins seem to be different. We are now investigating the functional divergence as well as the comprehensive mechanism of these EDEM family proteins. We are also working on the involvement of N-linked sugars on the ERQC, the molecular mechanism of retrotranslocation of misfolded substrates, and the molecules responsible for the ubiquitination of ERAD substrates on the ER membrane. (By N. Hosokawa)

We found using an *in vitro* PURE system that cytosolic chaperonin CCT specifically prevents aggregation and assists folding of the trimeric G protein β subunit ($G\beta$). $G\beta$ has β -propeller structures composed of anti-parallel β -sheets of WD40 repeats. Binding analysis by native PAGE indicated that CCT preferentially binds β -strand-containing proteins, but not proteins lacking β -strands. Detailed mutation analysis of $G\beta$ further indicated that CCT recognizes hydrophobic residues aligned on the same side of β -strands in the WD2 repeat of $G\beta$. To investigate the role of CCT in preventing aggregation of β -sheets *in vivo*, we used polyglutamine (polyQ)-expansion proteins as a substrate. Knockdown of the ζ or α subunits of CCT resulted in increased aggregation of polyQ and huntingtin (htt) exon 1. Fluorescent correlation spectroscopy, which detects fluorescent molecules at single molecule level, indicated that CCT depletion results in the appearance of small soluble aggregates of polyQ or htt. Overexpression of all eight subunits of CCT inhibited htt aggregation and toxicity in differentiated neuronal cells. Thus, CCT prevents the toxicity of β -sheet-rich proteins probably by altering the folding states. In addition, we found that disease-causing mutants of a CCT-related protein, MKKS, undergo rapid degradation through a ubiquitin-proteasome system mediated by the quality control E3 ubiquitin ligase CHIP. (By H. Kubota)

Recently, we have started the new project on ER redox regulation. For the efficient ERAD, intramolecular and intermolecular disulfide bonds should be reduced to produce an open (unfolded) conformation without aggregates or oligomer formation of the substrates. As is well known, however, ER is in oxidative environment, which suggests the existence of some reductase(s) in the ER for the thiol cleavage. We have identified and cloned ERdj5 as EDEM-binding J-domain-containing chaperone-like protein in the ER, and interestingly it has reductase activity for disulfide bonds of the model substrate, insulin. This reductase activity was shown to be necessary for the efficient degradation of misfolded proteins in the ER. We are now performing various experiments to establish the involvement and the importance of this molecule in ERAD system, which is conducted under the leadership by Jun Hoseki, a postdoc researcher in our lab. (By K. Nagata)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Nagasawa, N., Higashi, T, Hosokawa, N., Kaufman, R.J. & Nagata, K. : Simultaneous induction of the four subunits of TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO reports* in press
- Hosokawa, N., Wada, I., Natsuka, Y. & Nagata, K. : EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded α 1-antitrypsin. *Genes Cells*. **11** (15) 465-476 (2006)
- Kubota, S., Kubota, H. & Nagata, K. : Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of G β from aggregation by recognizing hydrophobic β -strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (22) : 8360-8365 (2006)
- Kitamura, A., Kubota H., Pack, C., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R. & Nagata, K. : Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biol.* **8** (10) : 1163-1169 (2006)
- Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H.P. & Nagata, K. : Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in ER and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **17** : 2346-2355 (2006)
- Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, LO., Herscovics, A., Nagata, K. & Hosokawa, N. : EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein ERAD and man-nose trimming. *J. Biol. Chem.* **281** (14) : 9650-9658 (2006)
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K. & Mori K. : Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell. Biol.* **172** (3) : 383-393 (2006)
- Oguro, A., Sakurai, T., Fujita, Y., Lee, S., Kubota, H., Nagata, K. & Atomi, Y. : The molecular chaperone HSP47 rapidly senses gravitational changes in myoblasts. *Genes Cells*. **11**, 1253-1265 (2006)
- Koide, T., Asada, S., Takahara, Y., Nishikawa, Y., Nagata, K. & Kitagawa K. : Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. Minimal structural requirement and spatial molecular orientation. *J. Biol. Chem.* **281** (6) : 3432-3438 (2006)
- Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., Yamazaki, C.M., Takahara, Y., Homma, DL., Otaka, A., Wakamiya, N., Nagata, K. & Kitagawa, K. : Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J. Biol. Chem.* **281** (16) : 11177-11185 (2006)
- Hirai, K., Kikuchi, S., Kurita, A., Ohashi, S., Adachi, E., Matsuoka, Y., Nagata, K. & Watanabe, M. : Immunohisto-chemical distribution of heat shock protein 47 (HSP47) in scirrhou carcinoma of the stomach. *Anticancer Re-search* **26** : 71-78 (2006)
- Chiba, S., Yokota, S.I., Yonekura, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., Fujii, N. & Matsumoto, H. : Autoantibod-ies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **241** : 39-43 (2006)
- Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E., Momose, Y., Sato, S M., Odani, M., Shimizu, H., Hasagawa-Mizusawa, M., Matsu-moto, R., Mizukami, S., Fujita, K., Parveen, M., Komatsu, Y. and Iwahashi, H. : Genome wide expression analy-

sis of yeast response during exposure to 4 degree C. *Extremophiles*. **10**(2) : 117-128 (2006)

2) 著書および総説

永田和宏, 中野明彦, 米田悦啓(編著): 細胞生物学, 東京化学同人(2006)

細川暢子: α マンノシダーゼと EDEM タンパク質: 糖タンパク質の小胞体関連分解に果たす役割. Glycoforum web site, Quality control, Trafficking and Sorting of Glycoproteins. QS-A02(2006)

Nobuko Hosokawa: α -Mannosidases and EDEM homolog proteins: Their roles in glycoprotein ERAD. Glycoforum web site, Quality control, Trafficking and Sorting of Glycoproteins. QS-A02(2006)

久保田広志, 永田和宏: コラーゲンと分子シャペロン. ティッシュ エンジニアリング 2006(日本組織工学会編) 15-17(2006)

久保田広志, 北村朗, 永田和宏: 細胞質シャペロニン CCT が異常タンパク質凝集の初期過程を抑制して細胞毒性を防止する. 細胞工学 in press

北村 朗, 久保田広志, 永田和宏: ポリグルタミンタンパク質凝集を抑え神経細胞を守るシャペロニン CCT- β シー ト配列を認識し凝集体の増大を防ぐ分子シャペロン-. パイオニクス Vol.3, No.12: 72-73(2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada, Kazuhiro Nagata: Involvement of N-linked oligosaccharides in the ERAD of misfolded human α 1-antitrypsin. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.18-23

細川暢子, 和田郁夫, 永田和宏: 糖タンパク質の小胞体関連分解-分解を調節する配列の検索-. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21

久保田広志, 久保田進, 永田和宏: 細胞質シャペロニン CCT は三量体 G タンパク質 β サブユニットの疎水的 β シー トを認識して凝集を抑制する. 第 6 回日本蛋白質科学会年会, 京都市, 2006.4.24-26

久保田広志, 久保田進, 永田和宏: 細胞質シャペロニン CCT は G β 中の 2 つの疎水性 β ストランドを介して β シー トを認識する. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21

Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Nagata: The clearance of misfolded CFTR mutant involves the ER membrane ubiquitin ligase, gp78. 2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, Vermont (USA), 2006.7.29-8.3

森戸大介, 平尾和義, 細川暢子, 徳永文穂, 田中啓二, 岩井一宏, 永田和宏: 小胞体膜貫通型ユビキチンリガーゼ gp78 の E4 活性による変異型 CFTR のユビキチン化. 第 1 回臨床ストレス応答学会大会, 京都市, 2006.11.22-23

森戸大介, 奥井大介, 鈴木匡, 細川暢子, 永田和宏: 小胞体ユビキチンリガーゼ HRD1 は糖タンパク質の脱糖鎖を促進する. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21

久保田進: 細胞質シャペロニン CCT のシャペロン機能と基質認識機構. H17 年度再生研若手研究者発表会, 京都市, 2006.3.15

Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata: Mammalian TRAP complex,

- induced by ER stress, accelerates the degradation of misfolded proteins in the ER. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.18-23
- Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto, Kazuhiro Nagata: Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering oligomeric aggregation state. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.18-23
- Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto, Kazuhiro Nagata: Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering oligomeric aggregation state. 2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, Vermont (USA), 2006.7.29-8.3
- Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto, Kazuhiro Nagata: Fluorescence correlation spectroscopy detects polyglutamine small oligomers increased by knock-down of cytosolic chaperonin CCT. 第5回東アジア生物物理学シンポジウム & 第44回生物物理学会年会, 宣野湾市, 2006.11.12-16
- 北村 朗, 久保田広志, 白 燦基, 松本 弦, 平山尚志郎, 高橋保夫, 木村 宏, 金城政孝, Richard Morimoto, 永田和宏: 細胞質シャペロニン CCT はポリグルタミンタンパク質凝集体形成を抑えることで神経細胞死を防ぐ. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21
- 潮田 亮, 寶関 淳, 新木和孝, 細川暢子, David Y Thomas, 永田和宏: EDEM と結合する小胞体タンパク質 ERdj5 の機能解析～小胞体における還元力～. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21
- 平山尚志郎, 山崎祐自, 北村 朗, 小田裕香子, 森戸大介, 大川克也, 木村 宏, 久保田広志, 永田和宏: McKusick-Kaufman syndrome タンパク質の疾患原因変異体は E3 リガーゼ CHIP を介してユビキチン-プロテアソーム系で素早く分解される. 第 1 回臨床ストレス応答学会大会, 京都市, 2006.11.22-23
- Shoshiro Hirayama, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Daisuke Morito, Katsuya Okada, Hiroshi Kimura, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata: McKusick-Kaufman syndrome protein shuttles to the centrosome and its mutants are rapidly degraded upon mutations via ubiquitin-proteasome pathway. 日本分子生物学会 2006, 名古屋市, 2006.12.6-8
- 平山尚志郎, 山崎祐自, 北村 朗, 小田裕香子, 森戸大介, 大川克也, 木村 宏, 久保田広志, 永田和宏: McKusick-Kaufman Syndrome タンパク質の機能と, その疾患原因変異体の CHIP による品質管理機構. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21
- 新木和孝, 寶関 淳, 潮田 亮, 永田和宏: 小胞体タンパク質 ERdj5 のレダクターゼ活性—in vitro の解析—. 平成 18 年度特定領域研究「タンパク質の一生」班会議, 宮城県刈田郡蔵王町, 2006.12.18-21
- 小田裕香子: 哺乳動物細胞の小胞体関連分解における逆輸送機構. H17 年度再生研若手研究者発表会, 京都市, 2006.3.15
- 浅田真一, 西川良美, 山崎ちさと, 本間大輔, 高原佳史, 永田和宏, 北川幸己, 小出隆規: HSP47 によって認識されるコラーゲン様 3 本らせん上の構造モチーフの同定及び網羅的基質検索. 第 53 回マトリックス研究会, 箱根, 2006.3.25-26
- 浅田真一, 西川良美, 高原佳史, 山崎ちさと, 本間大輔, 大高 章, 永田和宏, 北川幸己, 小出隆規: コラーゲン

特異的分子シャペロン HSP47 の網羅的基質探索. 日本薬学会第 126 年会, 仙台市, 2006.3.28-30

Tadashi Kikuchi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata, Tadashi Suzuki, Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame : Herp accelerates the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by promoting the retrotranslocation and deglycosylation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.18-23

Koji Ohashi, Taku Tamura, Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada : Real-time analysis of retrotranslocation of terminally misfolded secretory proteins by fluorescence correlation spectroscopy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.18-23

2) 招待講演・シンポジウム

永田和宏：新しい測定技術を用いたタンパク質フォールディングの解析. 特定領域研究「界面物理」班会議特別講演, 京都市, 2006.3.17

永田和宏：タンパク質フォールディングと品質管理, シンポジウム「タンパク質輪廻転生—Reincarnation of Proteins—」(三原勝芳博士退職記念シンポジウム), 唐津市, 2006.5.19-20

永田和宏：タンパク質のフォールディングと品質管理. 日本薬学会東海支部特別講演(名古屋市立大学大学院薬学研究科生命分子薬学特論講義), 名古屋市, 2006.6.8

Kazuhiro Nagata : Cytosolic Chaperonin CCT : substrate recognition and the role in protein quality control. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.6.23

Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin CCT/TRiC prevents the aggregate formation of WD40-repeat proteins and polyQ proteins. CREST 第 4 回研究代表者拡大連絡会議特別講演, 東京都, 2006.7.25

Kazuhiro Nagata, Susumu Kubota, Akira Kitamura, Shoshiro Hirayama, Hiroshi Kubota : Cytosolic chaperonin CCT/TRiC prevents the aggregation of β -sheet-containing proteins. 2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, Vermont (USA), 2006.8.2

永田和宏：細胞内におけるタンパク質の品質管理機構. 産総研セミナー, 東京都, 2006.8.17

永田和宏：分子シャペロンによるタンパク質のフォールディングと品質管理. 第 67 回応用物理学会学術講演会シンポジウム, 草津市, 2006.8.30

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 と繊維化疾患. 第 2 回産学情報交流会, 京都市, 2006.10.20

Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. APOCB 2006 (アジア太平洋細胞生物学会), 北京 (China), 2006.10.28

永田和宏：タンパク質の品質管理機構. 聖マリアンナ医科大学大学院セミナー, 川崎市, 2006.11.8

永田和宏：小胞体におけるタンパク質の品質管理機構. CREST 研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成 13 年度採択課題終了シンポジウム, 東京都, 2006.12.6

永田和宏：細胞内タンパク質の品質管理機構. 大阪大学微生物病研究所学術講演会, 特別講演, 吹田市, 2006.12.15

細川暢子：小胞体関連分解を促進する EDEM ファミリータンパク質の機能解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第 4 回公開シンポジウム, 名古屋市, 2006.1.31

Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Susumu Kubota, Shoshiro Hirayama and Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin CCT prevents aggregation and toxicity of beta-sheet-rich proteins through specific interactions. 第 1 回臨床ストレス応答学会大会シンポジウム「タンパク質のミスフォールディングと疾患」, 京都市, 2006.11.22-23

久保田広志, 北村 朗, 久保田進, 平山尚志郎, 永田和宏: 細胞質シャペロニン CCT は β シートタンパク質の凝集を防ぐ. 日本分子生物学会 2006 シンポジウム「細胞内のタンパク質社会と品質管理」, 名古屋市, 2006.12.6

生体微細構造学分野 Department of Ultrastructural Research

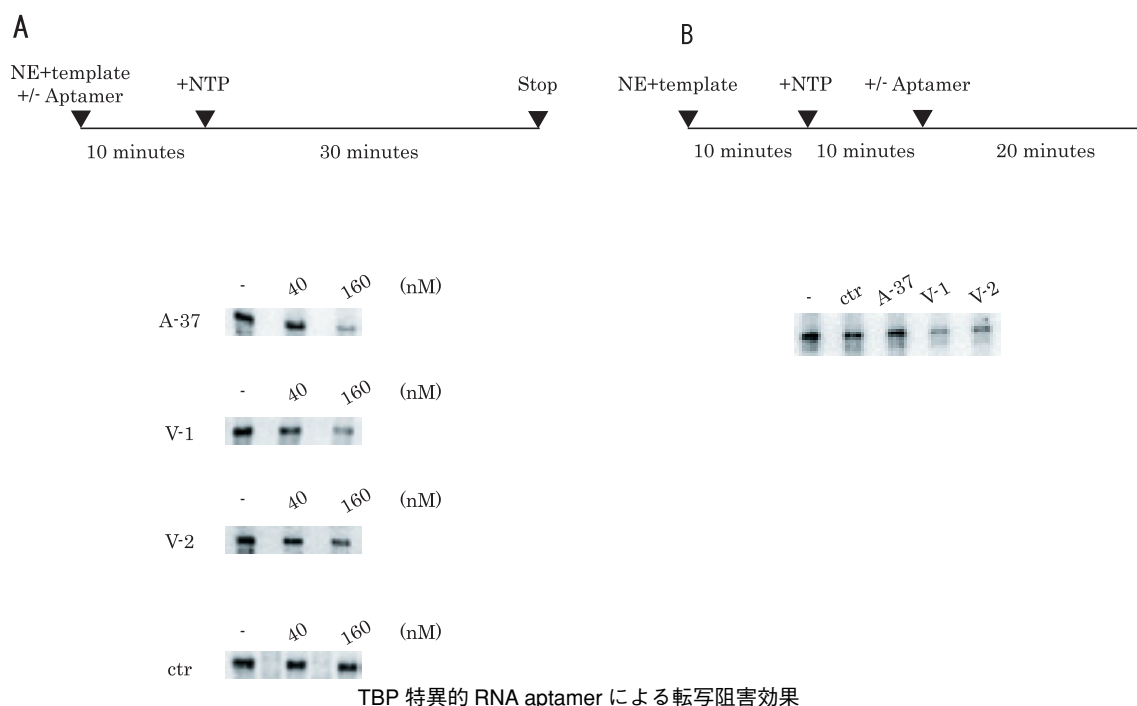
講師 平芳 一法

Lect. Kazunori Hirayosi

【研究概要】

転写, 古くて新しいこの命題は, 生命科学の基本問題として存在し, 未だに多くのブラックボックスを内包している. 我々は, 2つの因子, TBP(TATA Binding Protein)と GAF(GAGA Factor)を手がかりとして, 遺伝子特異的な転写機構, 転写伸長機構, クロマチン構造変換因子と転写活性化について解析を進めている. 転写装置のハブとして働く TBP は, DNA 上に存在する TATA 配列を認識し, 転写複合体を構築するための足場を提供することで, 全ての転写に共通の基本転写に必須の因子として機能している. TBP は生体内では単独で機能するのではなく, 複合体を形成した後に TATA 配列に結合し, その機能を発揮すると考えられている. これが TFIID と呼ばれる複合体である. TFIID は TBP と, それに結合する多種にわたる TAF(TBP associated factor)からなり, 大きな複合体を形成している. この複合体の機能を解析するため, TBP の部位特異的に結合し, TAF を含む他因子との結合を阻害する RNA aptamer を選別・取得した. 種々の遺伝子を鋳型とした転写反応にこの aptamer を加えたところ, 遺伝子によってその影響が異なり, TFIID 自身にも, 遺伝子特異性を規定する機能が備わっていることが分かってきた. TBP を核とする転写装置は転写開始後, その酵素としての担い手である RNA PolymeraseII を含めた一部を切り離した後, そのままそこに残り, 再利用される RNA PolymeraseII の結合に備えていると考えられていた. しかし, 我々が, RNA aptamer をプローブとしてこの過程を解析したところ, TBP を核とする複合体は安定な構造体ではなく, TFIID も含めて流動的な構造を取っていることが明らかになった.

発見当初, 転写活性化因子として同定された GAF は, ショウジョウバエ特異的に存在し, 発生過程で重要な働きをするホメオボックス遺伝子群発現パターンを維持する *trithorax* 群のひとつ *Trithorax-like (Trl)* にコードされ, 転写調節領域に存在する GAGA 配列に結合する. その後の研究から, クロマチンリモデリング因子と関連してクロマチンの巻きほぐしに関与することが明らかにされてきた. 発生やストレス応答などに関与する遺伝子の多くは, GAF 依存的遺伝子として知られ, GAF が結合することで, 転写可能な状態になる. しかし, 我々の実験では, クロマチン構造をとらない DNA に対しても転写活性を示したことから, クロマチン構造とは関連しない, 他の活性化機構の存在が示唆された. この機構を明らかにするため, TBP と同様, GAF 特異的な RNA aptamer を獲得し, *in vitro* 転写系を用いて解析を行った. GAF の機能を阻害すると転写伸長反応が阻害され, この段階に関与しているものと考えられる. また, この阻害は GAF 依存的な遺伝子特異的であり, GAF 依存性は転写調節領域の GAGA 配列以外にも何らかの機構により調節されている可能性があることを示した. これらの結果は, 転写反応, 特に転写リサイクルと伸長過程における新たな調節機構を示唆するものである.



A: 転写に与える阻害効果

転写反応の開始時に RNA aptamer を添加すると、コントロール(ctr)に比して、種類に関係なく転写を阻害しているのが分かる。

B: 転写再開時における RNA aptamer の阻害効果

転写開始後 10 分を経て添加された RNA aptamer は、その種類によって阻害効果に差を生じさせた。A は、TBP の DNA への結合を阻害し、V は他因子との結合を阻害させると考えられる。これらのことから他因子との結合阻害は転写再開し反応においても、転写を阻害し得ることを示している。

一連の実験に解析ツールとして使用した RNA aptamer は、抗体と同様に、分子特異的に高い結合力を示し、細胞内での扱いに優れているなどの特徴から、医薬品としての応用を期待されている。我々は、生体内で効率的に働く aptamer 分子の構築を試みている。多量体を作成すると、一定の段階まで親和性が増大し、阻害剤としての効果が著しく増大することを明らかにした。生体内では一定時間で分解されるという特徴を生かし、必要なときにのみ働く、副作用の少ない薬剤となるよう、上述の方法を含め、その分子の構築方法に工夫を加えている。

The transcription, old and new theme in the life science field, includes a lot of black box. We focus on two molecules, TBP (TATA Binding Protein) and GAF (GAGA binding factor), as a key molecule, to resolve the mechanisms of gene specific regulation, transcriptional elongation and gene activation through the chromatin structure. TBP, the “hub” molecule for the general transcription provides the scaffold to establish the transcription complex. TBP works as a TFIID complex, which consists of TBP and its associated protein TAF (TBP Associated Factors). To analyze this complex, we selected RNA aptamers that inhibit the binding between TBP and its binding factors. When we put these aptamers into *in vitro* transcription reaction, different inhibitory effect of aptamers was shown by gene dependent manner that means the existence of gene specific regulation mechanism by TFIID itself. TBP cored scaffold complex for transcription was believed that stay on the site after the RNA polymerase II, the core enzyme for transcription, leaves from the pre-initiation with tight formation, but our result with TBP specific aptamer showed dynamic regulation.

The GAF (GAGA factor) of *Drosophila* is a sequence -specific DNA binding protein that is involved in a variety of different nuclear process. GAF is encoded by the trithorax-like (*Trl*) gene, which is required for the normal expression of the homeotic genes. Many genes including stress protein and developmental stage specific in *drosophila* is

controlled by GAF. It was proposed that GAF can cooperate with chromatin remodeling factors to modify chromatin structure. GAF is also activating the transcription with naked DNA by our experiment that suggests the different activation mechanism. Using a GAF specific aptamer, which we selected, we showed the involvement of GAF in the transcriptional elongation step by gene specific manner.

For expanding the application of RNA aptamer as a cure drug or examination reagent, we tried to establish the construct protocol for more effective aptamers.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会発表

Hohmura K., Hirayoshi, K. : Functional analysis of GAGA factor in transcription by RNA aptam. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006 6.18-23 Kyoto

Hirayoshi, K., Hohmura, K., : The analysis of transcription complex by RNA aptamer 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006 6.18-23 Kyoto

生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

分野主任 教授 坂口 志文

Prof. Shimon Sakaguchi

【研究概要】

(1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては応答しない。このような免疫自己寛容の基礎的メカニズムとして、制御性T細胞による自己反応性T細胞の抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病の原因となる。転写因子 Foxp3 は、制御性T細胞の発生・分化のマスター制御分子である。またサイトカイン IL-2 が制御性T細胞の維持に不可欠であり、従って IL-2 レセプター (IL-2R) も制御性T細胞の必須分子である。本年度、Foxp3 による IL-2, IL-2R の転写制御機構について解析を進めた。

(2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

内在性制御性T細胞の増殖あるいは機能強化を図り、自己免疫病の予防・治療、移植臓器の拒絶反応の抑制、免疫寛容の導入が可能である。前年度に引き続き、制御性T細胞に特異的に発現する機能分子を探索し、そのような細胞表面分子に対する単クローン抗体の作製を試みた。その結果、G 蛋白結合性レセプター Gpr83, 転写因子 helios などが特異的に制御性T細胞に発現することを見だし、現在それぞれについて解析を進めている。移植免疫については、制御性T細胞の抗原特異的増殖による移植免疫寛容誘導が可能であることを示した。

(3) 新しい動物モデルを用いた慢性関節リウマチ(リウマチ様関節炎)の原因・発症機構の研究

免疫病理学的にヒトのリウマチ様関節炎と酷似する慢性関節炎を自然発症するマウスモデル (SKG マウス) を確立し、その原因・発症機構を解析している。この関節炎は、正常関節抗原を認識・攻撃する T 細胞による自己免疫性関節炎である。本年度、この関節炎発症にサイトカイン IL-17 が必須であることを見いだした。IL-17 欠損 SKG マウスは関節炎を発症しない。さらに、IL-6 は IL-17 産生関節炎惹起性 T 細胞分化に必須のサイトカインであり、IL-6 欠損は完全に関節炎発症を抑制した。

This department studies : (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etio-pathology of autoimmune disease ; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance ; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis.

One aspect of immunologic self-tolerance (i.e., immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is actively maintained through a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4⁺ T cells. We have shown that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function.

This year, we have attempted to understand the molecular basis of the development and function of regulatory T cells. DNA micro-array analysis has revealed several genes that are specifically up-regulated in regulatory T cells. They include Gpr83, a G protein-coupled orphan receptor and helios, a transcription factor, which appears to act upstream to Foxp3. These molecules can be exploited as specific markers for regulatory T cells and also as the molecular targets of manipulating regulatory T cells to induce transplantation tolerance or provoke effective tumor immunity.

We are also investigating the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis (RA) by analyzing a mouse model (called SKG mice) established in our department. SKG mice, which have a mutation of the gene encoding ZAP-70, a T cell-specific signaling molecule, spontaneously develop arthritis in a conventional environment, but not in a microbially clean environment. This year, we have investigated the role of the cytokine IL-17 in SKG arthritis. IL-17-deficient SKG mice indeed failed to develop arthritis. Furthermore, IL-6 is required for the differentiation of self-reactive T cells to IL-17-secreting arthritogenic effector T cells as IL-6-deficiency blocked the development of IL-17-secreting cells and thereby completely inhibited the occurrence of arthritis. This provides the molecular basis for the therapeutic effect of IL-6 neutralization in RA.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. : T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ helper T cells causing autoimmune arthritis. *J Exp Med*. In press.

Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'connor E, Graf D, Cook T, Smale ST, Sakaguchi S, Livesey FJ, Fisher AG, Merkenschlager M. A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med*. 203 : 2519-2527, 2006.

Yamaguchi T, Sakaguchi S. : Skin controls immune regulators. *Nat Med*. 12 : 1358-1359, 2006.

- Katakai T, Nomura T, Gonda H, Sugai M, Agata Y, Nishio A, Masuda T, Sakaguchi S, Shimizu A. : Spontaneous Large-Scale Lymphoid Neogenesis and Balanced Autoimmunity versus Tolerance in the Stomach of H^{+}/K^{+} -ATPase-Reactive TCR Transgenic Mouse. *J Immunol.* 177(11) : 7858-67, 2006.
- Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. : Regulatory T cell-mediated suppression : potential role of ICER. *J Leukoc Biol.* 2006 Oct 6
- Lee SK, Choi BK, Kim YH, Kang WJ, Kim KH, Sakaguchi S, Suh JH, Kim TY, Kwon BS. : Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related receptor signalling exacerbates hapten-induced colitis by $CD4^{+}$ T cells. *Immunology.* 119(4) : 479-87, 2006.
- Nagahama, K., and Sakaguchi, S. : Preparation of regulatory T cells in vitro. In *Immunological Tolerance : Methods and Protocols*, edit. P. J. Fairchild, Humana Press, In press.
- Matsubara Y, Hori T, Morita R, Sakaguchi S, Uchiyama T. : Delineation of immunoregulatory properties of adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Hematol.* 84 : 63-69, 2006.
- Kobayashi K, Suda T, Nan-Ya K, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Miki I. : Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis. *Inflamm Res.* 55 : 335-341, 2006.
- Wing, K. and Sakaguchi, S. : Regulatory T cells in allergy. *Curr. Opin. Allergy and Immunol.* 6(6) : 482-8, 2006.
- Sakaguchi, S. : Introduction : Regulatory T cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 28(1) : 1-2, 2006.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. : Peacekeepers of the immune system. *Sci Am.* 295 : 56-63, 2006.
- Wing, K., Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. : Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int. Immunol.* 18 : 991-1000, 2006.
- Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S. : Foxp3-dependent and -independent molecules specific for $CD25^{+}CD4^{+}$ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* 18 : 1197-1209, 2006.
- Nishioka, T., Shimizu, J, Iida, R., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. : $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T cells and $CD4^{+}CD25^{-}Foxp3^{+}$ T cells in aged mice. *J. Immunol.* 176 : 6586-6593, 2006.
- Ramirez-Montagut T, Chow A, Hirschhorn-Cymerman D, Terwey TH, Kochman AA, Lu S, Miles RC, Sakaguchi S, Houghton AN, van den Brink MR. : Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family Related Gene Activation Overcomes Tolerance/Ignorance to Melanoma Differentiation Antigens and Enhances Antitumor Immunity. *J Immunol.* 176 : 6434-6442, 2006.
- Sakaguchi, S. : Regulatory T cells : meden agan. *Immunol. Rev.* 212 : 5-7, 2006.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. : $CD25^{+}CD4^{+}$ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212 : 8-27, 2006.
- Cohen AD, Diab A, Perales MA, Wolchok JD, Rizzuto G, Merghoub T, Huggins D, Liu C, Turk MJ, Restifo NP, Sakaguchi S, Houghton AN. : Agonist anti-GITR antibody enhances vaccine-induced $CD8^{+}$ T-cell responses and tumor immunity. *Cancer Res.* 66 : 4904-4912, 2006.
- Kim, J., Choi, W. S, Kim, H. J., Suh, J-H., Sakaguchi, S., and Kwon B. : Conversion of alloantigen-specific $CD8^{+}$ T-cell priming through in vitro ligation of glucocorticoid-induced TNF receptor. *J. Immunol.* 176 : 5223-5231, 2006.
- Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S. : Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoim-

- immune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing naturally arising CD4⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 176 : 4748-4756, 2006.
- Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. : The dichotomous roles of IL-2 : tolerance versus immunity. *Trends Immunol.* 27 : 109-111, 2006.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Hata, H., Takahashi, T., and Nomura, T. : Spontaneous development of autoimmune arthritis due to genetic anomaly of T cell signal transduction : Part 1. *Semin. Immunol.* 18 : 199-206, 2006.
- Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. : Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16 : 115-123, 2006.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T., Hata, H., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Hirota, K., Nomura, T., and Sakaguchi, N. : SKG mice, a monogenic model of autoimmune arthritis due to altered signal transduction in T cells. *In The hereditary Basis of Rheumatic Diseases, Progress in Inflammation Research.* Edited by Rikard Holmdahl, Birkhaeuser Verlag, Basel, p147-159, 2006.
- Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T. : Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 305 : 51-66, 2006.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. : T lymphocytes : Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* Wiley Interscience, 2006. Available at www.els.net.

2) 総 説

- 田中 聡, 坂口志文 : 新しいリウマチモデルとしての SKG マウスー単一遺伝子突然変異が生む自己免疫性関節炎 Annual Review 2006 免疫 224-230
- 長濱寛二, 坂口志文 : ドナー特異的移植免疫寛容の導入 医学のあゆみ 2006 Vol.217 No.5(541-544)
- 坂口教子, 坂口志文 : 自己免疫疾患モデル動物から学ぶこと (SKG マウス) medicina 2006 Vol.43 No.6 (914-916)
- 野村尚史, 坂口志文 : 免疫自己寛容のメカニズム medicina 2006 Vol.43 No.6 (894-896)
- 田中 聡, 坂口志文 : 制御性 T 細胞による自己免疫疾患の制御 分子リウマチ Vol.3 No.3 2006. (199-203)

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

- 畑 洋, 中村孝志, 塩沢俊一, 三森経世, 坂口教子, 坂口志文 : 関節リウマチ (RA) 患者における TCR シグナル遺伝子 (ZAP-70 and CD3z chain) の遺伝子解析について 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2006.4.23-26. 長崎)
- 森元千晶, 前田朋子, 吉富啓之, 藤井克樹, 正木秀幸, 坂田恒昭, 鈴木隆二, 坂口教子, 坂口志文 : SKG マウス関節炎由来 T 細胞クローン移入による関節炎・間質性肺炎の誘導 第 50 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2006.4.23-26. 長崎)
- 廣田圭司, 岩倉洋一郎, 坂口志文 : SKG マウス自己免疫性関節炎における IL-17 の役割 第 16 回 Kyoto T Cell Conference (2006.6.2-3.)
- 杉本直志, 種田貴徳, 廣田圭司, 中村恭子, 野村尚史, 内山 卓, 坂口志文 : DNA マイクロアレー解析による Foxr3

依存性および非依存性の CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞特異的分子の同定 第 16 回 Kyoto T Cell Conference (2006.6.2-3.)

Kanji Nagahama : Transplantation Tolerance by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. World Transplant Congress (2006.7.22-27. Boston, USA)

Kanji Nagahama, Tomoyuki Yamaguchi, Keiji Hirota, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi. : Transplantation Tolerance by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Tomoya Katakai, Takashi Nomura, Hiroyuki Gonda, Manabu Sugai, Shimon Sakaguchi, Akira Shimizu. : Spontaneous lymphoid neogenesis and balanced autoimmunity versus tolerance in the stomach of H+/K+-ATPase-reactive TCR transgenic mouse. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Naoshi Sugimoto, Takatoku Oida, Keiji Hirota, Kyoko Nakamura, Takashi Nomura, Takashi Uchiyama, Shimon Sakaguchi. : Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

山口智之, 坂口志文. : CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の誘導. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Kajsa Wing, Haruhiko Yagi, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi. : The influence of GITR signaling on human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell mediated suppression. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Hanna Igarashi, PIAO Jinhua, Yosuke Kamimura, Hideyuki IWAI, Masaaki Hashiguchi, Teruo Amagasa, Shimon Sakaguchi, Miyuki Azuma. : GITR-mediated costimulatory function in CD25⁻ conventional and CD25⁺ regulatory CD4 T cells. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Yosuke Kamimura, Hanna Igarashi, PIAO Jinhua, Hideyuki IWAI, Masaaki Hashiguchi, Shimon Sakaguchi, Miyuki Azuma. : Involvement of GITR-mediated costimulatory function in contact hypersensitivity. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Masahiro Ono, Hiroko Yaguchi, Naganari Ohkura, Issay Kitabayashi, Takashi Nomura, Yoshiki Miyachi, Toshihiko Tsukada, Shimon Sakaguchi. : A mechanism of IL-2 repression by Foxp3 and a Foxp3-interacting protein. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Hiroko Yaguchi, Masahiro Ono, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Toshihiko Tsukada. : Identification of an RNA binding protein involved in alternative splicing of CD45 pre-mRNA. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

Keiji Hirota, Motomu Hashimoto, Hiroyuki Yoshitomi, Satoshi Tanaka, Takashi Nomura, Yoichiro Iwakura, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi. : Contribution of IL-6 to spontaneous differentiation into IL-17-producing arthritogenic T cells in SKG mice. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

海江田信二郎, 水野美歩, 大木伸司, 坂口志文, 坂口教子, 山村 隆, 三宅幸子 : SKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006.12.11-13. 大阪)

2) 講演・シンポジウム

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 3 回 びわこリウマチと免疫セミナー (2006.1.28. 大津)

坂口志文 : 免疫制御 : 自己免疫, 腫瘍免疫, 移植免疫の制御に向けて 平成 17 年度第 2 回 COE セミナー (2006.2.21.

京都)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 25 回 岡山免疫懇話会 (2006.3.1. 岡山)

Shimon Sakaguchi : Natural Tregs and Autoimmune Diseases Keystone Symposia Tolerance, Autoimmunity and Immune Regulation (2006.3.21-25. Colorado, USA)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells in autoimmunity and tumor immunity Washington University immunology seminar (2006.3.27. St. Louis, USA)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 2 回 肝免疫・ウイルス・フロンティア (2006.4.15. 名古屋)

野村尚史：制御性 T 細胞による免疫制御とその応用 第 6 回鎌倉カンファレンス (2006.4.15-16. 横浜)

Shimon Sakaguchi : Control of Immune Responses by Naturally Occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells The 15th International Rheumatology Symposium (2006 4. 23-26. Nagasaki, Japan)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 50 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2006.4.23-26. 長崎)

坂口教子：SKG/Jcl マウス 第 53 回日本実験動物学会総会 (2006.5.11. 神戸)

坂口志文：制御性 T 細胞による移植免疫寛容の誘導 Renal Transplantation Forum 2006 (2006.5.13. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 27 回 癌免疫外科研究会 (2006.6.1. 小倉)

Shimon Sakaguchi : FoxP3 Regulatory T Cells , the American Diabetes Association 66th Scientific Session (2006.6.9-13. Washington D.C., USA)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 5 回四国免疫フォーラム (2006.6.24. 徳島)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 医薬基盤研究所セミナー (2006.6.27. 大阪)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 71 回日本インターフェロン、サイトカイン学会 (2006.7.7-8 兵庫)

坂口教子：SKG マウス：ZAP-70 遺伝子変異による関節リウマチモデルマウス 第 24 回日本骨代謝学会 (2006.7.6-8. 東京)

坂口志文：自己免疫性関節炎モデルにおける自己反応性 T 細胞のサイトカイン依存性について 第 2 回自己免疫疾患研究会 (2006.7.8. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞による癌免疫制御 第 10 回基盤の癌免疫研究会総会 (2006.7.13-14. 札幌)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御 日本免疫学会 免疫サマースクール 2006 (2006.8.6-9. 千葉)

Shimon Sakaguchi : Keynote lecture Regulatory T cells : Key controllers of immune responses Fondation Merieux International Symposium Control of anti-tumoral and anti-infectious immune responses by regulatory T cell subsets : Potential clinical applications (2006.9.25-27. Annecy, France)

山口智之：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 34 回日本臨床免疫学会総会 (2006.10.2-3. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 京都大学再生医科学研究所平成 18 年度学術講演会 (2006.10.10-11. 京都)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 アステラス製薬加島研究所セミナー (2006. 10. 13 大阪)

Shimon Sakaguchi : Foxp3-expressing regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease The 8th International Congress of Neuroimmunology (2006.10.15-19. Nagoya, Japan)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells in self-tolerance and autoimmunity 1st Mediterranean Workshop Clinical Immunology (2006.10.26-29. Evora, Portugal)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 56 回日本アレルギー学会 (2006.11.2-4. 東京)

Shimon Sakaguchi : Control of Immune Responses by Naturally Occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ Regulatory

T Cells Joint International Symposium of POSTECH-Rheumatism Research Center : T Cell Memory and Tolerance (2006.11.8-9. Pohang, Korea)

Shimon Sakaguchi : Control of Immune Responses by Naturally Occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells The 53rd Annual Autumn Conference of Korean Association of Immunologist (2006.11.10. Seoul, Korea)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells for immunologic tolerance and negative control of immune responses NIAID REGULATORY T CELL WORKSHOP (2006.11.20-21. Bethesda, MD USA)

Shimon Sakaguchi : Naturally arising regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease Harvard Medical School Wednesday Immunology Seminar (2006.12.6. Boston, MA USA)

Shimon Sakaguchi : T Cell Self-Reactivity and Cytokines in Spontaneous Autoimmune Arthritis The Eighth Annual Harvard Autoimmunity Symposium (2006.12.8. Boston, MA USA)

Shimon Sakaguchi : Control of physiological and pathological immune responses with regulatory T cells 第36回日本免疫学会総会(2006.12.11-13. 大阪)

坂口志文：制御性T細胞の最近の知見 第36回日本免疫学会総会(2006.12.11-13. 大阪)

坂口志文：制御性T細胞，免疫系の平和維持監視者 独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 免疫難病・感染症等の先進医療技術 第3回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京)

生体システム制御学分野 Department of Medical Systems Control

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

【研究概要】

・はじめに

造血幹細胞は、骨髄で、リンパ球を含むすべての血液細胞を一生にわたり恒常的に産生し続ける代表的な組織幹細胞であり、血液学や幹細胞生物学の研究対象として重要であるだけでなく、臨床医学においては再生医療における細胞移植療法のプロトタイプである骨髄幹細胞移植に用いられ、白血病をはじめとする悪性腫瘍(がん)の化学療法による完全治癒に大いに貢献している。造血幹細胞は、骨髄の中に想定されているニッチ(臓器内で必須の分子を供給する特別な微小環境)で、必須の分子を産生するストローマ細胞と呼ばれる由来が不明の間質細胞により維持されていると推測されて来た。2003年に米国のLiらは骨辺縁の骨芽細胞が造血幹細胞ニッチであると報告したが、2005年にMorrisonらは、造血幹細胞を濃縮する分画の可視化に成功し、造血幹細胞の多くは骨髄腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在し、骨辺縁の造血幹細胞は少数であると報告した。しかし、いずれの報告においても、純粋な造血幹細胞が可視化されたとは言い切れない他、ニッチの構成細胞や、造血幹細胞の増殖や維持に必須のニッチよりのシグナルも十分明らかでない。

私たちは、これまでに、ケモカイン CXCL12 とその生理的受容体 CXCR4 が、胎児肝、骨髄での B リンパ球の産

生や胎生期における造血幹細胞の骨髄へのホーミング(細胞が臓器に移動, 定着すること)に必須であることを明らかにし, CXCL12 を高発現する細胞が胎児骨髄の血管周囲に局在し, 造血幹細胞のホーミングにおけるニッチとして働いている可能性を示してきた(Nagasawa, T., et al. Nature 1996 ; Tachibana, K., et al. Nature 1998 ; Egawa, T., et al. Immunity 2001 ; Ara, T., et al. Immunity 2003). また, CXCL12 を高発現する細胞(以下 CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞)が, 成体骨髄において間質の細網細胞(ストローマ細胞)の一部として存在し, 早期の B リンパ球前駆細胞や, 二次リンパ器官で抗原と反応することにより最終分化し骨髄に戻ってくる形質細胞(抗体産生に特化した細胞), 未分化造血細胞の大部分が, CAR 細胞に接着していることを見出した(Tokoyoda, T., et al. Immunity 2004). 本年は, 成体骨髄の造血幹細胞における CXCL12-CXCR4 シグナルの役割の研究, 造血幹細胞ニッチの構成細胞についての研究から興味深い知見が得られた.

・CXCL12-CXCR4 シグナルの造血幹細胞における役割

CXCL12 欠損マウスと CXCR4 欠損マウスは胎生期に致死であるので, 私たちは MxCre/loxP システムによる誘導性遺伝子欠損マウスシステムを用いて, 成体の CXCR4 遺伝子を欠損させ, 成体骨髄の造血幹細胞における CXCL12-CXCR4 シグナルの役割を解析した. MxCre/CXCR4^{flox/flox} マウスでは, インターフェロンの産生を誘導する pIpC の投与により, インターフェロン反応性のプロモーターの下流で Cre 遺伝子が発現し, 大部分の細胞の CXCR4 遺伝子が欠損する(誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウス). 誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウスの骨髄では, これまでの知見と整合して B リンパ球数が著減しており, 骨髄球系細胞は軽度に減少していた. 一方, 赤血球系細胞は対照マウスと著差なかったことからすべての血球系細胞の起源である造血幹細胞は正常ではないかと予想された. しかしながら, HSC を濃縮する分画の細胞数定量や機能的定量法を用いた解析を行ったところ, 誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウス骨髄の造血幹細胞は存在するがその細胞数は, 対照マウスと比較して著明に減少していた. 次に, より分化が進んだ多能性前駆細胞分画を解析したところ, 誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウスでは, その細胞周期が亢進しており, 細胞数は対照マウスと同様に保たれていた. 野生型および CXCR4 欠損骨髄細胞が混在したキメラマウスの解析より, 誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウスでは, 造血幹細胞の CXCR4 の欠損によりその細胞数が減少し, 骨髄のニッチを含む微小環境が多能性前駆細胞の細胞周期を亢進させるシグナルを出し, 骨髄球系細胞や赤血球系細胞数が維持されていることが示唆された. 成体の骨髄では, 外界よりの血液細胞に傷害を与えるストレスに対応するため, 造血幹細胞が静止期のまま一定数維持されていると考えられており, 実際, 誘導性 CXCR4 遺伝子欠損マウスでは, 未分化な血液細胞に毒性のある薬物の投与による致死率が著明に増加していた. 以上より, CXCL12-CXCR4 シグナルは, 成体骨髄において, 造血幹細胞数の維持に必須であることが明らかになった.

・造血幹細胞ニッチと CAR 細胞

上記の知見より, CXCL12 を発現する細胞の解析は, 造血幹細胞ニッチを考える上で重要であると考えられたため, CXCL12 の生理的な発現細胞を可視化することができる CXCL12 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入したマウス(CXCL12/GFP ノックインマウス)を用いて成体骨髄での CXCL12 の発現をより詳細に検討した. その結果, 主たる CXCL12 の発現細胞は, CAR 細胞(前述)で, 骨辺縁の骨芽細胞の一部, 血管内皮細胞の一部に CAR 細胞より著明に弱い CXCL12 の発現が認められた. また, CAR 細胞は, 骨辺縁の骨芽細胞とは異なる細胞で, 興味深いことに洞様毛細血管の大部分は CAR 細胞に取り囲まれていることが明らかとなった. 更に, 前述した Morrison らの方法を含む 2 種類の免疫染色法を用いて, 造血幹細胞と CAR 細胞の関係を観察すると, 30~50% 造血幹細胞を含むと考えられている造血幹細胞分画の細胞の 90% 以上が CAR 細胞と接着していた. 洞様毛細血管周囲では, 血管内皮細胞の外側を CAR 細胞が取り囲みその外側に造血幹細胞分画の細胞が接着していることが観察された. また, 一部の造血幹細胞分画の細胞は, Morrison らの報告と一致して骨辺縁付近に局在していたが, それらの細胞の大

部分が CAR 細胞と接着していた。

・おわりに

以上より、CXCL12-CXCR4 シグナルは、成体骨髄において、造血幹細胞数の維持に必須であることが明らかとなり、骨辺縁以外にもびまん性に分布し洞様毛細血管の周囲を取り囲む CXCL12 を高発現する CAR 細胞が造血幹細胞ニッチの本質的な構成細胞である可能性が示唆された。造血幹細胞の維持に関しては、主として肝臓で産生されるトロンボポイエチンが必須であることがすでに報告されており、CXCL12 は、骨髄微小環境で産生されるはじめての造血幹細胞の維持に必須のサイトカインとなる。私たちの知見は、微小環境による造血幹細胞の維持や動態を制御する分子機構の理解を大きく進めるものであると考えられる。

Chemokines are a family of small structurally related molecules that were recognized originally for their ability to regulate cell trafficking in inflammation. We have shown that a chemokine, CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor/pre-B-cell growth stimulating factor (CXCL12/SDF-1/PBSF) and its primary physiologic receptor CXCR4 are essential for embryonic viability, development of B lymphocytes, colonization of bone marrow by hematopoietic cells, colonization of the gonads by primordial germ cells (PGCs) and cardiovascular formation during ontogeny (Nagasawa et al. *Nature* 382, 635-638 (1996) ; Tachibana et al. *Nature* 393, 591-594 (1998) ; Egawa et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001)).

On the other hand, we have found that a small population of stromal cells expressing high amounts of CXCL12, which we call CXCL12-abundant reticular (CAR) cells are scattered throughout bone marrow. Most of multipotent hematopoietic progenitors, pre-pro-B cells and the end-stage B lymphocytes plasma cells were attached to CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments niches for primitive hematopoietic progenitors and B lymphocytes (Tokoyoda et al. *Immunity* 20, 707-718(2004)).

In recent years, we have studied the role of CXCL12 in HSCs in adult bone marrow and their interaction with CAR cells. In adult bone marrow, the special niches are thought to nurture a pool of HSCs, which give rise to all types of blood cells including lymphocytes and myeloid cells. It has been shown previously that many HSCs reside near the vasculature and some are found near bone surfaces but the molecular regulatory mechanism of niches for HSC maintenance remains unclear. We have shown that the induced deletion of CXCR4 in adult mice, resulted in severe reduction of HSC numbers and increased sensitivity to myelotoxic injury, although it did not impair expansion of the more mature progenitors. Most HSCs were found in contact with CAR cells, which surrounded sinusoidal endothelial cells or were located near the endosteum. These findings indicate that CXCL12-CXCR4 signaling plays an essential role in maintaining the quiescent HSC pool, and suggest that CAR cells appear to be a key component of HSC niches, including both vascular and endosteal niches in adult bone marrow.

This study revealed for the first time the environmental factor essential for maintaining the HSC pool and produced by bone marrow stromal cell niches, including vascular niches, where many HSCs might reside. Considering that CXCL12 also acts on other organ-specific stem cells including PGCs, our findings provide a novel basis for probing the molecular mechanisms that control maintenance of the stem cell pool within microenvironmental niches in mammals.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, JF., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W., Louache, F. Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. *Blood* 107 ; 2243-2251 (2006).
- Yurugi-Kobayashi, T., Itoh, H., Schroeder, T., Nakano, A., Narazaki, G., Kita, F., Yanagi, K., Hiraoka-Kanie, M., Inoue, E., Ara, T., Nagasawa, T., Just, U., Nakao, K., Nishikawa, S., Yamashita, JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 ; 1977-1984 (2006).
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25 ; 977-988 (2006).

2) 英文総説

- Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow for B-cell development. *Nature Rev. Immunol.* 6 ; 107-116 (2006).

3) 和文総説及び著書

- 長澤丘司：ケモカインと造血・造血幹細胞. 血液フロンティア 16 ; 23-32 (2006).
- 長澤丘司：骨髓微小環境の制御因子ケモカイン CXCL12 と血球・リンパ球の初期発生. 炎症と免疫 14 ; 3-12 (2006).
- 長澤丘司：再生医療におけるサイトカイン. 医学のあゆみ 第5. 土曜特集, 再生医学 217 ; 545-551 (2006).
- 長澤丘司：CXCL12 とその受容体 CXCR4 について. 再生医療の基礎シリーズ—生医学と工学の接点— 再生医療のための分子生物学, コロナ社. 136-137 (2006).

◆ 学会等の講演 ◆

1) 招待講演

- Nagasawa, T. : The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche. : Aegean Conferences ; 1st International Conference on Osteoimmunology : Interactions of the Immune and Skeletal Systems (2006.5.28-6.2. Crete, Greece)
- Nagasawa, T. : Roles of CXCL12 in controlling HSC and B lymphocyte behavior during development. : 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006.6.18-23. Kyoto, Japan)
- 長澤丘司：ケモカイン CXCL12 とその受容体 CXCR4 の幹細胞, 前駆細胞の移動・定着における役割：名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻主催セミナー (2006.6.28. 名古屋)
- 長澤丘司：ケモカイン CXCL12 (SDF-1/PBSF) と造血幹細胞の動態制御：第71回日本インターフェロン・サイトカイン学会・学術集会 (2006.7.7-8. 西宮)

長澤丘司：ケモカイン CXCL2 とその受容体 CXCL4 の機能：第 4 回血液サイトカイン研究会（2006.7.18. 佐賀）

長澤丘司：造血幹細胞ニッチ(niche)とケモカイン CXCL12：京都大学再生医科学研究所平成 18 年度学術講演会（2006.10.11. 京都）

長澤丘司，杉山立樹：骨髄ニッチ細胞とケモカイン CXCL12 による造血幹細胞，リンパ球形成の制御：日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」～コンファレンス&サイエンティフィック・エキジビション（2006.12.6-8. 名古屋）

生体再建学分野 Department of Tissue Reconstruction

客員助教授 清木(古谷) 誠

Visiting Assoc. Prof. Makoto Seiki (Furutani)

【研究概要】

メダカ・ゼブラフィッシュを統合した新しい脊椎動物モデル系による臓器構築機構の解析

遺伝子群が、どのように個々の細胞のふるまいを経時的に制御することにより臓器形成が起こっているのかを理解することは、再生医療において臓器再生を正確に制御するための重要な情報となる。そのためには無脊椎動物で行われたように、臓器形成に異常を示す変異体群を系統的に分離し、浸襲を与えずに生きた個体での細胞のふるまいを解析する順遺伝学的アプローチが理想的である。しかし、脊椎動物では、機能を重複した遺伝子が複数存在するために、1つのモデル系では、全ての遺伝子に関する変異体を得ることも、ある遺伝子の機能のすべてを明らかにすることも不可能である。

われわれは、メダカを用いた初めての臓器形成に関する変異体の大規模スクリーニングの成果(図1, 表1)から、

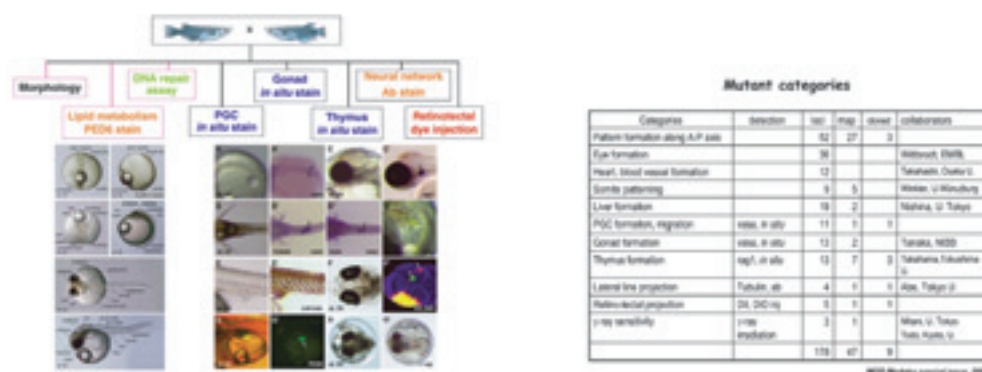


図1 メダカを用いた初めての変異体の大規模スクリーニングでは、生きた胚の形態だけでなく、生きた胚の観察では見ることのできない臓器や細胞を可視化してスクリーニングを行った。始原生殖細胞の移動、生殖巣の形成、神経繊維の投射などである。生理機能としても、肝機能としての胆汁産生、脂肪代謝、DNA 修復に関しての変異体を得ることができた。それらの変異体の統計を右の表に示した。

メダカとゼブラフィッシュを1つの新しいモデル系として用いることにより、脊椎動物において未知の遺伝子機能を見いだすことが可能であることを示した。遺伝子機能の重複の仕方が異なるだけでなく、発生過程での臓器形成過程を観察しやすいなどの特性からも、メダカとゼブラフィッシュはマウスとも相補的な役割を果たすことを提唱している。マウスと同様な逆遺伝学的アプローチを可能とするために、本学の武田、藤堂らと共同で、ノックアウトメダカを作成するシステムを初めて開発した。

Elucidation of mechanisms underlying organogenesis by combinatorial analysis in Medaka and zebrafish

To understand which set of genes regulate cell behaviors underlying organogenesis will be useful information to achieve organ regeneration in regenerative medicine. As proved powerful by *Drosophila* and *C. elegans*, it would be ideal to carry out systematic mutagenesis screen for mutations affecting organogenesis and analyze altered cell behaviors in those mutants *in vivo*. However, in vertebrates, it is impossible to uncover all the genes required for the organogenesis or whole function of the particular gene in a single model organism due to the presence of multiple genes with overlapping functions.

We have carried out a systematic mutagenesis screen using Medaka for the first time and found Medaka and zebrafish complement each other to uncover novel gene functions in vertebrates. In addition, Medaka and zebrafish also complement the mouse due to high accessibility of embryos during organogenesis. To make it possible to generate knock-out Medaka as in the mouse, we generated a such system in collaboration with Dr. Takeda and Dr. Todo in Kyoto University.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E. Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol.* 7 : R116 (2006)
- Okuda Y, Yoda H, Uchikawa M, Furutani-Seiki M, Takeda H, Kondoh H, Kamachi Y. Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev Dyn.* 235 : 811-25. (2006)



客員助教授 若山 照彦

Visiting Assoc. Prof. Teruhiko Wakayama

【研究概要】

卵子内にはもともと卵子および精子の核を初期化するための因子があり、クローン動物はその因子を借用して作られている。そのせいかクローン動物には原因不明の流産や奇形が多発してしまい、どの動物種でもわずか数%し

か生まれてこない。当研究室ではマウスを用いて、クローン技術の成績改善、クローン特有の異常の解明、及びクローン技術を利用して作られた体細胞由来ES細胞(ntES細胞)の特性解析などをおこなっている。またクローン技術を応用した遺伝資源の保存技術などにも力を入れている。

We use the mouse as a model system to study cloning under a range of experimental conditions with the goals of achieving improvements in the efficiency of the cloning procedure, gaining a better understanding of reprogramming mechanisms and analyzing the properties of ES cells derived via somatic nuclear transfer. We also use nuclear transfer technology to develop methods for preserving embryonic lethal and infertile strains of laboratory mice.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

- Kishigami S. et al. : Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Dev Biol.* **289** : 195-205 (2006)
- Thuan NV et al., Donor Centrosome Regulation of Initial Spindle Formation in Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer : Roles of Gamma-Tubulin and Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1. *Biol Reprod.* **74** : 777-787 (2006)
- Kishigami S et al., Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett* **580** : 1801-1806 (2006)
- Wakayama S et al., Equivalency of Nuclear Transfer-Derived Embryonic Stem Cells to those Derived from Fertilized Mouse Blastocyst. *Stem Cells* **24** : 2023-2033 (2006)
- Mizutani E et al., Developmental ability of cloned embryos from neural stem cells. *Reproduction* **132** : 849-857 (2006)
- Wakayama S et al. Establishment of mouse embryonic stem cell lines from somatic cell nuclei by nuclear transfer into aged, fertilization-failure mouse oocytes. *Current Biology* In press

生体組織工学研究部門

生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

Prof. Yuji Hiraki

【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靱帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

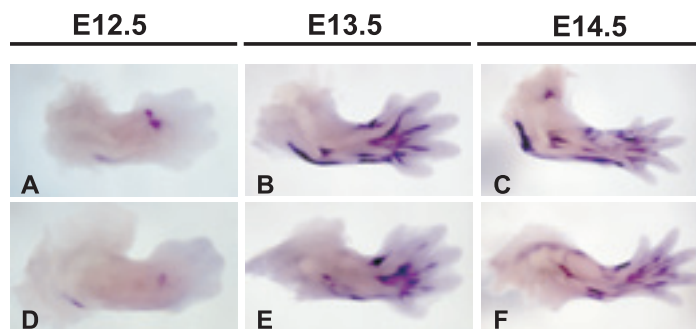
1. Chondromodulin-I に関する研究

(1) 心臓弁における Chondromodulin-I の発現と血管網制御

我々は、軟骨が無血管であることに着目して、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) を精製・クローニングした。ChM-I は無血管軟骨をはじめとして、胸腺、網膜に発現するが、最近新たに心臓の弁に発現することも明らかとなった。血管網の豊富な心臓の中であって、弁は特徴的に無血管であり、動脈硬化や心臓弁膜症といった病理的状況においてのみ血管の侵入を許す。我々は、正常な心臓弁の無血管領域において ChM-I が高く発現すること、また、ヒトの心臓弁膜症患者、或いは動脈硬化モデルマウスにおいて、その著しい発現低下が見られることを明らかにした。さらに、老齢の ChM-I 欠損マウスにおいて、血管侵入を伴う大動脈弁の石灰化、肥大化、或いは不整脈等、大動脈狭窄症の初期症状と似た症状が観察されることから、ChM-I が心臓弁の無血管性維持に直接関与することが明らかとなった。このように組織の血管網制御に重要な働きを持つ ChM-I の作用機序について、現在個体や細胞、或いは分子レベルでの解析を進めている。

(2) Chondromodulin-I の代謝に関する研究

ChM-I は 334 アミノ酸からなる膜貫通型前駆物質の C 末端部分であり、furin 認識切断部位 RERR でのプロセッシングと糖鎖修飾を受けることにより成熟型(120 アミノ酸残基、分子量約 25kDa)として細胞外に分泌され



マウス胚の四肢における *Tenomodulin* (*TeM*) mRNA の発現

TeM 遺伝子の発現は、12.5 日目以降のマウス胚の四肢の腱原基において検出される (A, D)。腱原基の形成が進行する 13.5 日目胚において、前肢では、総指伸筋腱、尺側手根伸筋腱、長橈側手根伸筋腱、上腕三頭筋腱 (B) など腱原基での発現が見られる。後肢においても、長趾屈筋腱、長趾伸筋腱、後頸骨筋腱、長腓骨筋腱、などにおける発現が観察される (E)。14.5 日目胚では腱の形成がさらに進行し、*TeM* 遺伝子の発現領域も、腱に特徴的な細長いひも状の組織形態を示している (C, F)。

る。一方、軟骨組織中には成熟型以外にも、その限定分解産物と考えられる short form ChM-I が検出される。また ChM-I が、軟骨無血管領域に高発現する一方で血管侵入を受ける肥大化/石灰化軟骨層では消失すること、ここで高発現する MMP-13 の基質となりうることも明らかとなった。これらの結果は、ChM-I の作用が、細胞外分泌後のプロセッシングや分解除去という過程を経て、巧みに制御される可能性を示唆している。現在、このような ChM-I の代謝制御機構とその生理的意義について解析を進めている。

2. 軟骨分化制御の分子機構に関する研究

内軟骨性骨形成過程では、未分化間葉細胞から凝集過程を経て分化した軟骨細胞は、分化成熟を遂げて肥大化し、周囲の基質は石灰化する。我々は、このような軟骨の多段階分化過程を、前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いて *in vitro* で再現することができる培養系を構築した。平成 16 年度には、独立行政法人日本学術振興会の日独共同研究プロジェクトとして、ドイツの GSF Research Center for Environment and Health の Institute of Developmental Genetics と共同で、軟骨の多段階分化過程におけるトランスクリプトーム解析を開始した。最終的に、ATDC 5 細胞の未分化期 (day 2)、成熟軟骨細胞期 (day 21)、肥大化・石灰化軟骨細胞期 (day 42) の Long SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ライブラリーを構築し、各ライブラリーからおよそ 67,000 タグの遺伝子発現情報を得た。現在、これらのライブラリーにおいて、差次的に発現する遺伝子群の軟骨性骨原基での発現パターンを解析し、*in vivo/in vitro* にて機能解析を行っている。

3. 腱・靱帯特異的な転写制御領域の解析

腱・靱帯は、栄養血管が極めて乏しいため、外傷などの瞬間的な外力によって、一旦、損傷すると、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。これらの組織の機能障害は関節症などとも密接に関連しており、運動器の組織再生の重要な標的となっている。しかしながら、これまで、腱・靱帯細胞を特徴付ける特異的な分子マーカーが知られていなかったため、その分化誘導機構の解析はほとんどなされていなかった。一方、我々が ChM-I 関連遺伝子として同定した TeM (Tenomodulin) は、腱・靱帯を含む強靱結合組織の分化に伴って発現が誘導される II 型膜貫通型の血管新生抑制因子である。そこで、TeM の腱・靱帯特異的な転写制御機構を解析することによって、腱・靱帯細胞の分化を制御するメカニズムを明らかにする研究を開始した。これまでに、初代トランスジェニックマウス胚を用いて、TeM 遺伝子の転写開始点上流-11 kb から+11.6 kb までの領域で、腱・靱帯に特異的な転写制御活性を有する 2 つのゲノム領域があることを見出している。

4. 関節軟骨の修復に関する研究

血管に富み旺盛な再生能力をもつ骨組織とは逆に、関節軟骨は極めて再生能力に乏しい。関節軟骨が損傷を受けると容易に変形性関節炎へ移行し、硝子軟骨で再生させることは極めて困難である。関節軟骨全層欠損修復モデルは、軟骨初期分化を解析する有効な *in vivo* モデルで、軟骨再生に必要な細胞増殖・分化制御の解明に寄与すると考えられる。そこで、本研究室ではこれを用いて、軟骨再生の機構を解析している。すなわち、我々は Fibroblast growth factor-2 が骨髄由来間葉細胞の増殖と遊走を刺激して関節軟骨の再生修復に対して促進的に作用することを明らかにした。さらに、副甲状腺ホルモン受容体シグナルの活性化が関節軟骨の再生誘導に阻害的に作用すること、副甲状腺ホルモン受容体を発現する増殖性の間葉系細胞が軟骨欠損部位に集積することが関節軟骨の再生修復に不可欠であることなどを明らかにした。これら増殖分化因子とその応答性の解析から骨髄幹細胞システムの活性化による軟骨再生の基盤技術を開発している。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying mesenchymal vascularization or cartilage, bone and tendon/ligament formation. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Functional analysis of Chondromodulin-I

(1) Expression of Chondromodulin-I in cardiac valves and its function in preventing angiogenesis

We have previously purified and cloned Chondromodulin-I (ChM-I) as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the inhibitory activity of endothelial cell growth. ChM-I is abundantly expressed in the avascular zone of cartilaginous molds, and expressed in thymus and eye as well. Recently, we found that ChM-I was also expressed in cardiac valves. Although the heart is a vascular-rich organ, cardiac valves are avascular, and neovascularization can be detected only under pathological conditions such as atherosclerosis or valvular heart disease (VHD). We found that ChM-I is strongly expressed in the avascular regions of normal cardiac valves, but at markedly reduced levels in human VHD patients or aged mouse models for atherosclerosis. In addition, gene targeting of ChM-I resulted in neovascularization and unusual calcification in the cardiac valves of aged mouse, leading to valve thickening and turbulent flow, indicative of early changes in aortic stenosis. These data suggest the important function of ChM-I in maintaining cardiac valvular function by preventing angiogenesis. We are now further investigating the molecular mechanism of the anti-angiogenic activity of ChM-I using *in vivo* and *in vitro* systems.

(2) Metabolism of Chondromodulin-I

ChM-I is a 25-kDa glycoprotein that is secreted from chondrocytes after post-translational modification and cleavage from the transmembrane precursor protein at the site (RERR) for endoproteases like furin. In spite of abundant expression in the avascular zone of the cartilaginous molds, ChM-I is not detected in late hypertrophic/calcifying cartilage invaded by blood vessels. Recently, we found that a short form of ChM-I was present in cartilage extracts. Among matrix metalloproteinases tested, only MMP-13 cleaved glycosylated human recombinant ChM-I. Thus, ChM-I could be a novel substrate for MMP-13 that is expressed in hypertrophic/calcified cartilage. We are currently analyzing the molecular mechanism of ChM-I metabolism in cartilage.

2. Molecular mechanism of chondrogenic differentiation

During endochondral bone formation, undifferentiated mesenchyme condense to form the cartilaginous bone mold. In the developing cartilaginous mold, chondrocytes rapidly proliferate to synthesize a large amount of extracellular matrices such as type II collagen and aggrecan and mature to become hypertrophic. Then extracellular matrices around hypertrophic chondrocytes calcify. Subsequently, vascular invasion occurs and calcified cartilage is gradually replaced by bone. We previously established *in vitro* model of chondrogenic differentiation by using mouse embryonal carcinoma cell line ATDC5, which is currently used as one of the standard chondrogenic cell lines in the field of cartilage and bone mineral research. We have started the joint research project supported by JSPS (Japan Society for the Promotion of Science) in collaboration with Institute of Developmental Genetics (GSF-National Research Center for Environment and Health, Germany) for identification and functional analysis of genes that control chondrogenic differentiation during endochondral bone formation, taking advantage of ATDC5 *in vitro* model. We constructed three long SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) libraries from undifferentiated ATDC5 cells at day 2, mature ATDC5 cells

at day 21, and hypertrophic/calcified ATDC5 cells at day 42. We have analyzed ~67,000 tags from each library to identify genes differentially expressed during chondrogenic differentiation. Functional analysis of identified genes is currently underway both *in vivo* and *in vitro*.

3. Identification of tendon and ligament specific enhancer

Tendon and ligament are dense connective tissue composed of type I collagen rich extra cellular matrix secreted by fibroblasts. The role of tendon and ligaments are to connect skeletal elements with muscle or bone with bone enduring by mechanical force. They play important roles as locomotive organs, but little is known about the molecular basis of tendogenesis or ligamentogenesis due to a lack of specific differentiation marker molecules. We cloned *TeM* (*tenomodulin*) as a *ChM-I* related gene and found that *TeM* mRNA is predominantly expressed in fibroblasts of tendon and ligaments. To understand the molecular mechanisms of differentiation of tendon or ligament fibroblasts, we are currently analyzing the transcriptional regulation for the mouse *TeM* gene by using transgenic mice and cultured tenocytes. We examined the genomic region of the mouse *TeM* (from -11 kb to +11.6 kb) gene and found two genomic fragments that can drive tendon or ligament specific expression in mouse embryos.

4. Regenerative repair of articular cartilage

In contrast to bone, articular cartilage has a very limited capacity for repair. Cartilaginous lesion easily causes osteoarthritis. Therefore articular cartilage has been a target tissue in regenerative medicine. Full-thickness defects that penetrate articular cartilage undergo repair processes that result in the generation of either fibrous tissue or hyaline cartilage depending on the defect size. Undifferentiated mesenchymal cells participate in these repair processes. Taking advantage of this tissue-repair system as a model, we are studying the regulation of growth and differentiation of chondrogenic cells *in vivo*: Fibroblast growth factor-2 effectively stimulates both the mobilization and migration of replicating mesenchymal cells, thus functioning in support of a chondrogenic repair response. We demonstrated that parathyroid hormone (PTH)/PTH related-protein (PTHrP) signaling was inhibitory on the induction of chondrogenic repair of articular cartilage. The accumulation of PTH/PTHrP receptor-positive proliferating mesenchymal cells in the defect cavities critically correlated with the subsequent induction of cartilage regeneration, which can be a prognostic marker of repair.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Mizuta, H., Kudo, S., Nakamura, E., Takagi, K., Hiraki, Y.: Expression of the PTH/PTHrP Receptor in Chondrogenic Cells During the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **14**: 944-952 (2006)
- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., Hiraki, Y.: Scleraxis positively regulates the lineage-specific expression of tenomodulin, a marker for tenocytes. *Dev. Biol.* **298**: 234-247 (2006)
- Yoshioka, M., Yuasa, S., Matsumura, K., Shiomi, T., Shukunami, C., Okada, Y., Mukai, M., Shin, H., Yozu, R., Sata, M., Ogawa, S., Hiraki, Y., Fukuda, K.: Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat. Med.* **12**: 1151-1159 (2006)

- Kusafuka, K., Watanabe, H., Kimata, K., Hiraki, Y., Shukunami, C., Kameya, T. : Minute pleomorphic adenoma of the submandibular gland in the patients with oral malignancy : a report of two cases with histological and immunohistochemical examination. *Histopathology* in press (2006)
- Hosokawa, Y., Kaji, T., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kotani, E., Mori, H., Masuhara, H. : In situ Micro-patterning of Proteinaceous Occlusion Bodies in Water by Femtosecond Laser-Induced Mechanical Force. *Biomedical Microdevices* in press (2006)
- Ishii, I., Mizuta, H., Sei, A., Hirose, J., Kudo, S., Hiraki, Y. : Regeneration of Full-thickness Defects of Articular Cartilage in Rabbit Using FGF-2 and a Fibrin Sealant. *J. Bone Joint Surg, Br.* in press (2006)
- Yasukuni, R., Spitz, J.A., Meallet-Renault, R., Negishi, T., Tada, T., Hosokawa, Y., Asahi, T., Shukunami, C., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Realignment Process of Actin Stress Fibers in Single Living Cells Studied by Focused Femtosecond Laser Irradiation. *Appl. Surface Sci.* in press (2006)

2) 著書および総説

- Shukunami, C., Hiraki, Y. : Chondromodulin-I and Tenomodulin : the Negative Control of Angiogenesis in Connective Tissue. *Curr. Pharm. Design* in press ; (2006)
- Masuhara, H., Hosokawa, Y., Yoshikawa, H.Y., Nakamura, K., Sora, Y., Mori, Y., Jiang, Y.Q., Oh, I., Kaji, T., Mori, H., Hiraki, Y., Yamaguchi, A., Asashi, T. : Femtosecond Nonlinear Processing in Solution : From Crystallization to Manipulation and Patterning. (Chapter Review) In “*Nano Biophotonics*” Elsevier, in press (2007)
- 水田博志, 開 祐司 : 「成長因子による関節軟骨再生」 医学のあゆみ **216**(16) : 459-463 (2006)
- 手塚建一, 開 祐司 : 「骨・軟骨形成における誘導因子の働き」 ティッシュエンジニアリング 2006(監修 日本組織工学会, 編集 田畑泰彦, 岡野光夫) pp.18-23 : 日本医学館(東京) (2006)
- 開 祐司 : 《今日の話題》「血管新生抑制因子コンドロモジュリン-Iと間葉における組織血管化の制御」 化学と生物 **44**(12) : 796-798 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Hosokawa, Y., Kaji, T., Hiraki, Y., Mori, H., Masuhara, H. : Non-destructive micro-patterning of living cells and protein crystals by focused femtosecond laser. (Invited) Photonics West (2006.1.21-26. San Jose, California, USA)
- 三浦重徳, 宿南知佐, 西崎有利子, 開 祐司 : 脱落膜で発現する Chondromodulin-I は栄養膜細胞の浸潤を負に制御する. 第 53 回マトリックス研究会(2006.3.25-26. 箱根)
- 宿南知佐, Wahl, M., 西崎有利子, 伊東良太, 毛利公美, 開 祐司, Heinzmann, U., 今井賢治 : 軟骨分化過程における遺伝子発現プロファイリング. 第 53 回マトリックス研究会(2006.3.25-26. 箱根)
- 安國良平, 朝日 剛, 細川陽一郎, 開 祐司, 増原 宏 : マウス線維芽細胞内アクチンフィラメントのフェムト秒レーザー切断と収縮ダイナミクス. 日本化学会第 86 春季年会(2006.3.27-30. 船橋)
- Hosokawa, Y., Iguchi, S., Yasukuni, R., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Laser Micro-injection of Sugar Chain into Single Animal Cell : Application of Femtosecond Laser Ablation in Solution. XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry (2006.4.2-7. Kyoto)

- Yasukuni, R., Hosokawa, Y., Asahi, T., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Femtosecond laser-induced ablation and contraction dynamics of actin filaments in mouse NIH3T3 fibroblast cells. XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry (2006.4.2-7. Kyoto)
- Takimoto, A., Oro, M., Shibuya, M., Hiraki, Y., Shukunami, C. : Impaired cartilage formation by blocking VEGF signaling with soluble Flt-1 during chick limb development. 第38回日本結合組織学会学術大会 (2006.5.11-12. 前橋)
- Miura, S., Shukunami, C., Hiraki, Y. : Chondromodulin-I is expressed in the feto-maternal interface, decidua, and functions as a possible inhibitor of fetal trophoblast invasion (母体-胎仔境界形成に伴い Chondromodulin-I は脱落膜で発現し, 栄養膜細胞の浸潤を抑制する). 第38回日本結合組織学会学術大会 (2006.5.11-12. 前橋)
- Yasukuni, R., Hosokawa, Y., Asahi, T., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Dissection of biological filaments by femtosecond laser irradiation. The 4th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP2006) (2006.5.16-19. Kyoto)
- Iguchi, S., Yasukuni, R., Hosokawa, Y., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Biomaterial injection to single animal cell by focused femtosecond laser. The 4th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP2006) (2006.5.16-19. Kyoto)
- Takimoto, A., Oro, M., Hiraki, Y., Shibuya, M., Shukunami, C. : Impaired cartilage formation by blocking VEGF signaling with soluble Flt-1 during chick limb development. XIVth International Vascular Biology Meeting (2006.6.6-10. Noordwijkerhout, the Netherlands)
- 宿南知佐 : 骨格形成過程における VEGF signaling の役割. 第12回成人病の病因・病態の解明に関する研究会 (2006.7.1-2. 軽井沢)
- 宿南知佐, 大島佑介, 滝本 晶, 西崎有利子, 開 祐司 : 腱・靱帯に発現するテノモジュリンの血管新生抑制活性 第7回運動器科学研究会 (2006.8.25-26. 大津)
- Yasukuni, R., Spitz, J.A., Hosokawa, Y., Asahi, T., Shukunami, C., Hiraki, Y., Masuhara, H. : Realignment Process of Actin Stress Fiber Dissected by Focused Femtosecond Laser : Proceedings submitted to applied surface science. 5th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (2006.9.3-7. Charlottesville, Virginia USA)
- 安國良平, Spitz, J. A., Meallet-Renault, R., 細川陽一郎, 朝日 剛, 宿南知佐, 開 祐司, 増原 宏 : 細胞内アクチンフィラメントのフェムト秒レーザー切断と再生ダイナミクス. 分子構造総合討論会(共催: 日本化学会・日本化学会東海支部・応用物理学会) (2006.9.20-23. 静岡)
- 山口 敦, 細川陽一郎, 朝日 剛, 開 祐司, 増原 宏 : 集光フェムト秒レーザー誘起衝撃波による単一生細胞内への微粒子. 分子構造総合討論会(共催: 日本化学会・日本化学会東海支部・応用物理学会) (2006.9.20-23. 静岡)

2) 講演・シンポジウム

- Miura, S., Shukunami, C., Nishizaki, Y., Hiraki, Y. : A potential role of decidual chondromodulin-I in the control of cell migration and invasion of trophoblast giant cells. 文部科学省特定領域研究がん特性主催 血管生物学シンポジウム (2006.2.22. 金沢)
- 宿南知佐, 西崎有利子, 近藤俊哉, 開 祐司 : 骨・軟骨の血管化制御. 2006年度農芸化学会シンポジウム「骨と

脂質のホメオスタシス：農芸化学からのアプローチ」(2006.3.25-28. 京都)

宿南知佐：間葉系組織由来の血管新生抑制因子，東海医学会講演会(2006.3.27. 伊勢原)

開 祐司：組織血管化を制御する細胞外環境，第38回日本結合組織学会学術大会(2006.5.11-12. 前橋)

宿南知佐：骨格組織構築の『場』における組織間相互作用，第38回日本結合組織学会学術大会(2006.5.11-12. 前橋)

開 祐司：間葉組織の血管化制御－Chondromodulin-I と Tenomodulin の機能－，北海道大学大学院理学研究院生命理学部門(高分子専攻)談話会(2006.6.16. 札幌)

Hiraki, Y.: テンプルトン財団公開講演会・研究会「仏教と自然科学における知識と創造力」“Toward the end of modernization of the natural sciences”(2006.6.23-24. 京都)

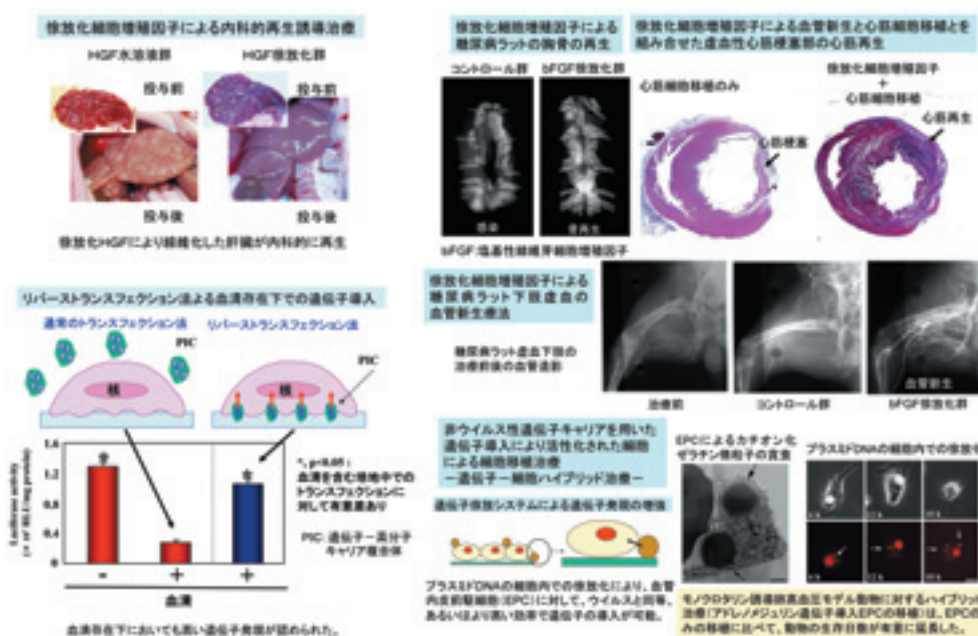
生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦
Prof. Yasuhiko Tabata

【研究概要】

本研究分野の目的は、医療に应用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料とは、体の中で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と直接に接触する状況で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生誘導治療(再生医療と呼ばれている)および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life(QOL)を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている状況の中で生まれてきたのが、細胞を活用、生体本来のもつ生体組織の再生誘導能力を基盤として病気を治療しようという試みである。この再生誘導治療(再生医療と呼ばれている)の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生医療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生誘導治療の目的は、細胞を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い(幹)細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいまでも



ないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生誘導治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および細胞増殖因子をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、生体内で分解吸収され消失する材料(生体吸収性材料)と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の生体内での役割が果たされた後にその場から消失するため、再び取り出す必要がなく、また、材料の存在が生体組織・臓器の再生を妨げないことである。生体材料が生体組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、細胞を患者自身から採取することができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS(ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法)および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性的高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生誘導治療のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

1) 生体組織の再生誘導治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、生体内では細胞外マトリックスと呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは組織の再生誘導の望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元

あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体(人工細胞外マトリックス)をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル物質が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル物質は生体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫がDDSである。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出(徐放)する。この徐放化技術によって、生体物質の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨の再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、この徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。一般に、拡張型心筋症、慢性腎炎、肝硬変、肺線維症など慢性疾患では病的部位は線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、内科的な薬物、遺伝子治療によって、この線維性組織を消化分解することができれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生誘導治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による内科的再生誘導治療を行っている。この概念は、生体のもつ再生誘導能力を活用するという点で、上記の足場、DDS技術を用いた外科的再生誘導治療と同じである。

2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生医療には、2つの方向性がある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生誘導治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い細胞を利用する細胞治療である。後者のためには、臨床応用可能な細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置(バイオリアクタ)の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生医療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけではなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供する。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウィルスクャリアの研究開発も行っている。幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化(遺伝子による機能改変)が有望である。これまでに、ウィルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウィルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウィルスクャリアを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の開発が強く望まれている。例えば、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を研究開発した。この技術を利用することによって、ウィルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められた。また、遺伝子と非ウィルスクャリアとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める(リバーストランスフェクション)技術も開発している。これらの一連の技術は、細胞の機能改変に利用可能であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても有効である。

3) DDSのための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択

性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因である。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これが DDS であり、その目的は薬物の徐放化、薬物の長寿化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの薬物、遺伝子治療のための DDS 研究を行っている。加えて、全身あるいは局所、粘膜ワクチン、核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断などに対しても、その予防ワクチンおよび診断効果を高めるためには DDS 的工夫が不可欠であり、予防および診断医学に対する DDS の研究開発も行っている。また、可溶化、安定化などの DDS 技術、方法論の化粧品、ヘルスケア領域への展開も進めている。

4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器(皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など)の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいは DDS 技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic biology on the basis of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are investigating biomaterials to assist reconstructive surgery and to apply to drug delivery systems (DDS) for the biomaterials-based improvement of therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitution. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the reverse effects of immunosuppressive agents. The two present medicines of up-to-date are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. In these circumstances, a new therapeutic trial, in which disease healing can be achieved based on the natural healing potential of patients themselves, has been explored. This is termed the therapy of regenerative medicine, where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially promoting the proliferation and differentiation of cells. The objective of regenerative therapy is to treat diseases by regenerating injured or lost tissues and substituting organ functions by making use of cells. The regenerative medical therapy is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint of no use of biomaterials and medical devices and no need of immunosuppressive agents, respectively. The basic idea of regenerative therapy is to give cells an environment site suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue and

organ regeneration. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment of regeneration induction. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biological signal molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently take advantage of various biomaterials recombining with all the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability have been mainly used for this purpose. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to allow to physically impair the physical process of natural tissue regeneration by the material remaining. Thus, biodegradable biomaterials are indispensable for the research and development (R&D) of regenerative medical therapy, DDS or basic biology and medicine.

Our research goal is to design and create biomaterials mainly from polymers which are practically applicable for regenerative medical therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for the Therapy of Regenerative Medicine

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for the proliferation and differentiation of cells or their morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, even if a superior scaffold is supplied to the tissue defect, the tissue regeneration will not be achieved without sufficient number of cells and the amount of cell proliferation cue signals. It is one of the practically possible ways to use growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible way to break through the problem is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently exert the biological activity, resulting in promoted tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. The induction of tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved. Among them, human experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF) and the good therapeutic efficacy is clinically demonstrated.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as dilated cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the

organ function is recovered. We are designing and preparing a system of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity to achieve the regeneration-induced therapy for chronic disease based on the natural regeneration potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regenerative therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with internal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), for cells with non-viral gene carriers.

2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Medicine and Biology

There are two approaches to realize regenerative medical therapy. One is the tissue engineering-based approach described above. The other is cell transplantation therapy to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. In addition, non-viral for vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, we have developed a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells and succeeded in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates with or without the combination of bioreactor systems has been developed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system is effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method while it can be applied for cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA).

3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their in vivo therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is an engineering trial which allows a drug to act at the right time and the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug lifetime, the acceleration of drug absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies are carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of “drug” is not limited to therapeutic sub-

stances, but it means every substance with a certain biological activity and function. The DDS technology and methodology are also being developed for preventive and diagnostic substances to enhance the in vivo efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are also developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences.

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at their assistance in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are pursuing comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells and in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney as well as the DDS technologies for therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines, while some biomaterials are applicable for basic of medicine and biology as the research tools.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

田畑泰彦：生体組織工学をベースとした再生誘導治療の最前線. *Urology View*. **4**(4) : 8-16(2006)

田畑泰彦：生体内バイオリアクタによる骨の再生医療. *バイオテクノロジージャーナル*. **6**(4) : 418-419(2006)

田畑泰彦：DDSは生物医学研究，医療，ヘルスケアのための基盤テクノロジー. *バイオテクノロジージャーナル*. **6**(5) : 553-555(2006)

田畑泰彦：再生医療を支える生体組織工学の最前線. 第13回皮膚創傷治癒フォーラム，特別講演. **1** : 12-15(2006)

田畑泰彦：分子標的薬開発の工学的アプローチ. *バイオテクノロジージャーナル*. **6**(6) : 773-776(2006)

Tabata, Y. : Potential of drug delivery technology in tissue regeneration therapy. *Journal of Hard Tissue Biology*. **15**(3) : 73-81(2006)

田畑泰彦：先端医療を支えるドラッグデリバリーシステム. *脈管学*. **46**(6) : 797-803(2006)

Tabata, Y. : Polymeric Biomaterials Necessary for Advanced Medical Therapy. *MACRO2006 Polymers for Advanced Technologies* (2006)

Hokugo, A., Sugimoto, K., Fukuda, A., Sawada, Y., Mushimoto, K., Morita, S., Tabata, Y. : Preparation of prefabricated vascularized bone graft with neoangiogenesis by combination of autologous tissue and biodegradable materials. *Int J Oral Maxillofac Surg*. **35**(11) : 1034-1040 (2006)

Hokugo, A., Tabata, Y. : Recent advances in tissue engineering for regeneration of oral tissues. *Inflammation and Re-*

- generation. **26**(2) : 82-91 (2006)
- Hokugo, A., Takamoto, T., Tabata, Y. : Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials*. **27**(1) : 61-67 (2006)
- Thakor DK, Spigelman I, Tabata Y, Nishimura I. : Subcutaneous peripheral injection of cationized gelatin/DNA polyplexes as a platform for noninvasive gene transfer to sensory neurons. *Molecular Therapy*. (in press)
- Haesslein, A., Ueda, H., Hacker, H. C., Jo, S., Ammon, D. M., Borazjani, R. N., Kunzler, J. F., Salamone, J. C., and Mikos, A. G.. : Long-term release of fluocinolone acetonide using biodegradable fumarate-based polymers. *Journal of Controlled Release*. **114**(2) : 251-260 (2006)
- Inoue, S., and Tabata, Y. : Influence of basic fibroblast growth factor in the solution and adsorbed form on the proliferation and differentiation of cells. *炎症再生医学会雑誌*. **26**(3) : 181-184 (2006)
- 城潤一郎, 岡崎有道, 田畑泰彦 : 遺伝子導入試薬としてのカチオン化多糖誘導体の合成. *日本化学繊維研究所講演集*. 第 **63** 集別冊 : 85-94 (2006)
- Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y. Liver Targeting of Plasmid DNA with a Cationized Pullulan for Tumor Suppression. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **6** (9-10) : 2853-9 (2006)
- Jo, J., Nagaya, N., Miyahara, Y., Kataoka, M., Shiba-Harada, M., Kangawa, K., and Tabata, Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction : Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. *Tissue Engineering*. in press.
- Okazaki, A., Jo, J., and Tabata, Y. A reverse transfection technology to genetically engineer adult stem cells. *Tissue Engineering*. in press.
- Kanatani, I., Ikai, T., Okazaki, A., Jo, J., Yamamoto, M., Imamura, M., Kanematsu, A., Yamamoto, S., Ito, N., Ogawa, O., Tabata, Y. Efficient gene transfer by pullulan-spermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms. *J Control Release*. **116**(1) : 75-82 (2006)
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng*. **12**(5) : 1305-1311 (2006)
- Hosseinkhani, H., Yamamoto, M., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., Shimokawa, H., and Tabata, Y. : Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials*. **27**(8) : 1387-1398 (2006)
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Furong Tian, Kobayashi, H., Tabata, Y. : Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self assembled-peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. **27** : 4079-4086 (2006)
- Hosseinkhani, H., Tony Azzam, Kobayashi, H., Hiraoka, Y., Shimokawa, H., Abraham J. Domb, Tabata, Y. : Combination of 3-D tissue engineered scaffold and non-viral gene enhance in vitro DNA expression of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. **27** : 4269-4278 (2006)
- Hosseinkhani, H., Tabata, Y. : Self assembly of DNA nanoparticles with polycations for the delivery of genetic materials into cells. *J. Nanoscience and Nanotechnology*. **6** : 2320-2328 (2006)
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Furong Tian, Kobayashi, H., Tabata, Y. : Ectopic bone formation in collagen sponge-self assembled peptide amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials*. **27** : 5089-5098 (2006)

- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Ali Khademhosseini, Kobayashi, H., Tabata, Y. : Enhanced angiogenesis through controlled release of basic fibroblast growth factor from peptide amphiphile for tissue regeneration. *Biomaterials*. **27** : 5836-5844 (2006)
- Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y. : Enhanced anti-fibrotic activity of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor for a mouse model of obstructive nephropathy by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J Control Release*. **110** : 610-617 (2006)
- Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata, Y. : Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds. *J Control Release*. **112** : 249-256 (2006)
- Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata Y. : In vitro transfection of plasmid DNA by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J Biomater Sci Polym Ed*. **17** : 645-658 (2006)
- Nakano, T., Ishimoto, T., Lee, J.-W., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., Kobayashi, A., Iwaki, H., Takaoka, K., Kawai, M., and Yamamoto, T. : Crystallographic approach to regenerated and pathological hard tissues. *Materials Science Forum*. **512** : 255-260 (2006)
- Ishimoto, T., Nakano, T., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Role of stress distribution on healing process of preferential alignment of biological apatite in long bones. *Materials Science Forum*. **512** : 261-264 (2006)
- Lee, J.-W., Nakano, T., Toyosawa, S., Ijuhin, N., Tabata, Y., Yamamoto, M., and Umakoshi, Y. : Role of osteoclast in preferential alignment of biological apatite (BAp) in long bones. *Materials Science Forum*. **512** : 265-268 (2006)
- Igai, H., Chang, S.S., Gotoh, M., Yamamoto, Y., Misaki, N., Okamoto, T., Yamamoto, M., Tabata, Y., and Yokomise, H. : Regeneration of canine tracheal cartilage by slow release of basic fibroblast growth factor from gelatin sponge. *ASAIO J*. **52** (1) : 86-91 (2006)
- Murata, M., Akazawa, T., Sasaki, T., Ito, K., Tazaki, J., Yamamoto, M., Tabata, Y., and Arisue, M. : Blood Permeability of a Novel Ceramic Scaffold for BMP-2. *J. Biomed. Mater. Res. B*. (in press)
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., Yamada, K., Kawakami, O., and Tabata, Y. : Skull bone regeneration in non-human primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng.* (in press)
- Liu, J., Ohta, S., Sonoda, A., Yamada, M., Yamamoto, M., Nitta, N., Murata, K., and Tabata, Y. : Preparation of PEG-conjugated fullerene containing Gd^{3+} ions for photodynamic therapy. *J. Control. Rel.* (in press)
- 丸井 晃, 田畑泰彦, 福島雅典, 北 徹, 中尾一和, 木村 剛, 伊藤 裕, 松井茂之, 長谷川浩二, 堀内久徳, 原田昌樹, 山本雅哉, 小島伸介, 仁科 健, 池田 義, 米田正始 : bFGF 徐放による「時間的・空間的」局所血管新生—安全性・低侵襲性への新たな試み—. *Cardiovascular Med-Surg*. **8** (2) : 203-207 (2006)
- Hirose, K., Marui, A., Arai, Y., Nomura, T., Inoue, S., Kamitani, T., Fujita, M., Mitsuyama, M., Tabata, Y., Komeda, M. : A Sustained-Release with Vancomycin to Prevent Prosthetic Graft MRSA Infection. *J Vasc Surg*. **44** (2) : 377-82 (2006)
- Hirose, K., Fujita, M., Marui, A., Arai, Y., Sakaguchi, H., Yuhong Huang, Shyamal Chandra BIR, Tabata, Y., Komeda, M. : Combined treatment of sustained-release basic fibroblast growth factor and sarpogrelate enhances collateral blood flow effectively in rabbit hindlimb ischemia. *Circulation journal*. **70** (9) : 1190-4 (2006)
- Hirose, K., Marui, A., Arai, Y., Nomura, T., Kaneda, K., Kimura, Y., Ikeda, T., Fujita, M., Mitsuyama, M., Tabata, Y.,

- Komeda, M. : A Novel Approach to Reduce Catheter-Related Infection Using Sustained-Release Basic Fibroblast Growth Factor for Tissue Regeneration in Mice. Heart and Vessels. (in press)
- Mima, H., Yamamoto, S., Ito, M., Tomoshige, R., Tabata, Y., Tamai, K., and Kaneda, Y. : Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol. Cancer Ther.* **5** : 1021-1028 (2006)
- Manome, Y., Kobayashi, T., Mori, M., Suzuki, R., Funamizu, N., Akiyama, N., Inoue, S., Tabata, Y., Watanabe, M. : Local delivery of doxorubicin for malignant glioma by a biodegradable PLGA polymer sheet. *Anticancer Research.* **26** : 3317-3326 (2006)
- Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J. : Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope.* **116** : 526-533 (2006)
- Takaba, K., Jiang, C., Nemoto, S., Saji, Y., Ikeda, T., Urayama, S., Azuma, T., Hokugo, A., Tsutsumi, S., Tabata, Y., Komeda, M. : A combination of omental flap and growth factor therapy induces arteriogenesis and increases myocardial perfusion in chronic myocardial ischemia : evolving concept of biologic coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **132** : 891-99 (2006)
- Nagae, M., Ikeda, T., Mikami, Y., Hase, H., Ozawa, H., Matsuda, K., Sakamoto, H., Tabata, Y., Kawata, M., and Kubo, T. : Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Engineering* (in press)
- Rivas-Carrillo, J.D., Navarro-Alvarez, N., Soto-Gutierrez, A., Okitsu, T., Chen, Y., Tabata, Y., Misawa, H., Noguchi, H., Matsumoto, S., Tanaka, N., and Kobayashi, N. : Amelioration of diabetes in mice after single-donor islet transplantation using the controlled release of gelatinized FGF-2. *Cell Transplant.* **15** : (in press)
- Lin X, Fujita M, Kanemitsu N, Kimura Y, Tambara K, Premaratne G.U., Nagasawa A, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M : Sustained-release erythropoietin ameliorates cardiac function in rat infarct heart without inducing polycythemia. *Circ J.* **71** : (in press)
- Y.S. Moon, H. Uyama, S. Inoue, Y. Tabata : Fabrication of non-woven mats of gelatin/poly(L-lactic acid) composites by electrospinning and their application for scaffold of cell proliferation. *Chem. Lett.* **35** : 564-565 (2006)
- Nagato, H., Umehayashi, Y., Wako, M., Tabata, Y., and Manabe, M. : Collagen-poly glycolic acid hybrid matrix with basic fibroblast growth factor accelerated angiogenesis and granulation tissue formation in diabetic mice. *Journal of Dermatology.* **33** : 670-675 (2006)
- Matsumoto, G., Kushibiki, T., Kinoshita, Y., Lee, U., Omi, Y., Kubota, E., Tabata, Y. : Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Science.* **97** : 313 (2006)
- Nishishita N., Morimoto Y., Tabata Y., Oka M., and Hirano Y. : Cell Adhesion Scaffold Using Self-assembled β -strand Peptides. *Peptide Science* 2005. 443-446 (2006)
- Inoue, A., Takahashi, K.A., Arai, Y., Tonomura, H., Sakao, K., Saito, M., Fujioka, M., Fujiwara, H., Tabata, Y., Kubo, T. : The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Arthritis Rheum.* **54** : 264-70 (2006)
- Fujiwara, H., Oda, K., Saiki, Y., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M., Tabata, Y., Tabayashi, K. : The wrapping method using biodegradable felt strips has a preventive effect on the thinning of the aortic wall : experimental study in

- the canine aorta. *Journal of Vascular Surgery*. **43** (2) : 349–56 (2006)
- Hamada, Y., Katoh, S., Hibino, N., Kosaka, H., Hamada, D., Yasui, N., Ozeki, M., Kimura, Y., and Tabata, Y. : Effects of monofilament nylon coated with basic fibroblast growth factor on endogenous intrasynovial flexor tendon healing. *J Hand Surg [Am]*. **31** (4) : 530–40 (2006) Erratum in : *J Hand Surg [Am]*. **31** (6) : 1034 (2006)
- F. Kurt, Kasper., Simon, Young., Tanahashi, K., Michael A. Barry, Tabata, Y., John A. Jansen, Antonios G. Mikos. : Evaluation of boen regeneration by DNA release from composites of oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in a critical-sized calvarial defect. *J. Biomedical Material Res*. **78A** : 335–342 (2006)
- F. Kurt, Kasper, Erin jenkins, Tanahashi, K., Michael A Barry, Tabata, Y., Antonios G. Mikos. : Characterization of DNA release from composites of oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, **78A** : 623–835 (2006)
- Kawakami, O., Miyamoto, S., Hatano, T., Yamada, K., Hashimoto, N., Tabata, Y. : Acceleration of aneurysm healing by hollow fiber enabling the controlled release of basic fibroblast growth factor. *Neurosurgery*. **58** (2) : 355–364 (2006)
- Nakae, M., Kimura, H., Naruse, K., Horio, N., Ito, Y., Mizubayashi, R., Hamada, Y., Nakashima, E., Akiyama, N., Kobayashi, Y., Wtarai, A., Kimura, N., Horuguchi, M., Tabata, Y., Oisa, Y., Nakamura, J. : Effects of basic fobroblast growth factor on experimental diabetic neuropathy in rats. *Diabetes*. **55** : 1470–1477 (2006)
- Jian Wang, Tabata, Y., Morimoto, K. : Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs : Evaluation of in vitro relase and in vivo insulin absorption in rats. *J. Controlled Release*. **113** : 31–37 (2006)
- Seki, T., Kanbayashi, H., Nagao, T., Chino, S., Tabata, Y., Morimoto, K. : Effect of cationized gelatins on the paracellular transport of drugs through Caco-2 cell monolayer. *J. Pharm. Sci.* **95** (6) : 1393–1401 (2006)
- Hiraoka, Y., Yamashiro, H., Yasuda, K., Kimura, Y., Inamoto, T., Tabata, Y. : In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering* **12** (6) : 1475–1487 (2006)
- Takahashi, S., Qin Chen, Ogushi, T., Fujimura, T., Kumagai, J., Matsumoto, S., Hijikata, S., Tabata, Y., Kitamura, T. : Periurethral injection of sustained release basic fibroblast growth factor improves sphincteric contractility of the rat urethra denervated by botulinum-A toxin. *J Urology*. **176** : 819–823 (2006)
- Tazaki, J., Akazawa, T., Murata, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Yoshimoto, R., Arisue, M. : BMP-2 dose-response and rerease studies in functionally graded Hap. *Bioceramics*. **18** : 965–968 (2006)
- Alejandro Soto-Gutierrez, Kobayashi, N., Jorge David Rivas-Carrillo, Nalu Navarro-Alvarez, Debaio Zhao, Okitsu, T., Noguchi, H., Hesham Basma, Tabata, Y., Yong Chen, Tanaka, K., Narushima, M., Miki, A., Ueda, T., Hee-Sook Jun, Tanaka, N., Jane Lebkowski, Ji-Won Yoon, Ira J Fox. : Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. *Nature Biotechnology*. **24** : 1412–1419 (2006)
- Hoshino, K., Kimura, T., AM De Grand, Yoneyama, R., Kawase, Y., S Houser, HQ Ly, Kushibiki, T., Furukawa, Y., Ono, K., Tabata, Y., JV Frangioni, Kita, T., RJ Hajjar, Hayase, M. : Three catheter-based strategies for cardiac delivery of therapeutic gelatin microspheres. *Gene Therapy*. **13** : 1320–1327 (2006)
- Ohta, S., Nitta, N., Takahashi, M., Sonoda, A., Tanaka, T., Yamasaki, M., Furukawa, A., Takazakura, R., Murata, K.,

Sakamoto, T., Kushibiki, T., Tabata, Y. : Pluronic F127 : Application in Arterial Embolization. J Vasc Interv Radiol. **17** : 533-539 (2006)

Kanemitsu, N., Tambara, K., Goditha Upul Premarane., Kimura, Y., Tomita, S., Kawamura, T., Hasegawa, K., Tabata, Y., Komeda, M. : Insulin-like Growth Factor-1 Enhances the Efficacy of Myoblast Transplantation With Its Multiple Functions in the Chronic Myocardial Infarction Rat Model. Journal of Heart and Lung. **25** (10) : 1253-1262 (2006)

鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙, 佐藤 聡, 小川 洋, 三宅将生, 挟間章博, 中村達雄, 金丸真一, 田畑泰彦, 大森孝一 : 第 18 回日本喉頭科学会予稿集. **72** (2006)

Hori, K., Sotozono, C., Hamuro, J., Yamasaki, K., Kimura, Y., Ozeki, M., Tabata, Y., Kinoshita, S. : Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. Journal of controlled release. (in press)

2) 著 書

田畑泰彦 : ウイルスを用いないで遺伝子導入を高める. 「ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開 遺伝子医学 MOOK5 先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー」(原島秀吉, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 19-21 (2006)

田畑泰彦 : 第 II 章 細胞増殖因子の DDS. 「細胞増殖因子と再生医療」(松本邦夫, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルレビュー社, 大阪) 19-30 (2006)

田畑泰彦 : 再生医療のためのバイオマテリアル. 「再生医療の基礎シリーズ 5—生医学と工学の接点—」(田畑泰彦編著, 株式会社コロナ社, 東京) (2006)

山本雅哉, 田畑泰彦 : ティッシュエンジニアリングと遺伝子治療. 「ティッシュエンジニアリング 2006」(田畑泰彦, 岡野光夫編集, 日本医学館, 東京) 88-96 (2006)

山本雅哉, 田畑泰彦 : 高分子によるターゲティング. 「ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開 遺伝子医学 MOOK5 先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー」(原島秀吉, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 124-129 (2006)

山本雅哉, 田畑泰彦 : ドラッグデリバリーシステム (徐放化). 「再生医療のためのバイオマテリアル」(田畑泰彦編集, 株式会社コロナ社, 東京) 160-178 (2006)

北郷明成 : 第 IV 章 6. 17) 血管柄付き移植骨. 「細胞増殖因子と再生医療」(松本邦夫, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルレビュー社, 大阪) 194-198 (2006)

城潤一郎, 田畑泰彦 : 第 1 章 5. 多糖. 「ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開 遺伝子医学 MOOK5 先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー」(原島秀吉, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 50-55 (2006)

城潤一郎, 岡崎有道, 田畑泰彦 : 第 2 章 7. 遺伝子発現増強のための培養方法の工夫—バイオリアクターの利用—. 「ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開 遺伝子医学 MOOK5 先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー」(原島秀吉, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 141-146 (2006)

今村正明, 小川 修, 田畑泰彦 : 泌尿器科領域の再生誘導治療の進歩. 「泌尿器科疾患の New Strategy」(村井 勝, 奥山明彦, 内藤誠二編集, メジカルビュー社, 東京) in press (2006)

- 丸井 晃, 田畑泰彦, 福島正典, 北 徹, 中尾一和, 木村 剛, 伊藤 松井茂之, 長谷川浩二, 堀内久徳, 原田昌樹, 山本雅哉, 小島伸介, 仁科 健, 池田 義, 米田正始: bFGF 徐放による「時間的・空間的」局所血管新生-安全性・低侵襲性への新たな試み.「Cardiovascular Med-Surg18(2)」(株式会社メディカルレビュー社, 大阪)203-207(2006)
- 木下鞠彦, 小園 知, 塗々木和男: 細胞増殖因子各論 6.bFGF 7) 顎骨.「細胞増殖因子と再生医療」(松本邦夫, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルレビュー社, 大阪)137-142(2006)
- 木下鞠彦, 天笠光雄: 顎骨の再生医療.「ティッシュエンジニアリング 2006」(田畑泰彦, 岡野光夫編集, 日本医学館, 東京)137-143(2006)
- 伊藤孝仁, 高島義嗣, 田畑泰彦: Erythropoietin.「細胞増殖因子と再生医療」(松本邦夫, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルレビュー社, 大阪)380-385(2006)

3)総 説

- 田畑泰彦: Tissue engineering の最前線.医学のあゆみ. **217(5)** : 4334-4338(2006)
- 田畑泰彦: 最先端医療と生物医学研究を支える化学. 化学. **61(4)** : 29-30(2006)
- 田畑泰彦: Tissue Engineering の最前線-生体組織の再生誘導治療を実現する医工学技術-医学のあゆみ. **217(5)** : 463-467(2006)
- 田畑泰彦: ティッシュエンジニアリングと遺伝子治療. ティッシュエンジニアリング. 88-96(2006)
- 田畑泰彦: 再生医療を躍進させるバイオマテリアルの最前線-生体材料研究の現状と今後の展開.化学. **61(8)** : 25-30(2006)
- 田畑泰彦: 生体組織の再生誘導能を高める細胞の人工ニッチの創製.バイオテクノロジージャーナル. **6(5)** : 544-545(2006)
- 田畑泰彦: 医科における再生医療の現在・未来 歯科への期待.補綴臨床別冊 再生治療. 24-33(2006)
- 田畑泰彦: ドラッグデリバリーシステム(DDS)と組織工学.人工臓器. **35(3)** : 1-5(2006)
- Tabata, Y. Regenerative inductive therapy based on DDS technology of protein and gene. J. Drug Target. **14(7)** : 483-495(2006)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 非侵襲で臓器復元を促す. 糖鎖と遺伝子のナノ複合体を注射, 内科的再生医療に手がかり, 臨床を視野に.NIKKEI NANO BUSINESS. **36** : 17-18 (2006)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞増殖因子の徐放技術と組織再生誘導. バイオマテリアル-生体材料-. **24(3)** : 176-185(2006)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 遺伝子導入研究に役立つ DDS.バイオテクノロジージャーナル. **6(5)** : 563-565 (2006)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞増殖因子の徐放技術と組織再生誘導.バイオマテリアル-生体材料-. **24(3)** : 176-185(2006)
- Yamamoto, M. and Tabata, Y. : Tissue Engineering by modulated gene delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. **58(4)** : 535-554(2006)
- Kaneda, Y. and Tabata, Y. : Non-viral vectors for cancer therapy. Cancer Sci., **97(5)** : 348-354 (2006)
- Yasukawa, T. Ogura, Y. Kimura, H. Sakurai, E. and Tabata, Y. : Drug delivery from ocular implants Expert Opinion Drug Delivery. **3(2)** : 261-273 (2006)
- 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 小川 修: 生体吸収性材料を用いた尿道再生の試み.Urology View. **4(4)** : 34-37

(2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Yamamoto, M., Takegoshi, M., Yanase, K., and Tabata, Y. : Fabrication of 3-dimensional cell scaffold with a spatial gradient of collagen. 2006 Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society. (2006.10.11-14. Chicago)

山本雅哉, 北郷明成, 高橋佳丈, 板坂 聡, 平岡真寛, 田畑泰彦: 放射線治療後の骨再生のための骨形成因子機能性足場材料の開発. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006.11.27-28. 東京)

北郷明成, 澤田育典, 虫本浩三, 森田章介, 田畑泰彦: 徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた sinus augmentation に関する実験的研究. 第 27 回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)

北郷明成, 蘭源太郎, 田畑泰彦: 徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた歯肉増大術に関する実験的研究. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

北郷明成: 細胞増殖因子の徐放化と骨再生. 第 4 回日本再生歯科医学会 (2006.9.9-10. 大阪)

Hokugo, A., Araragi G., Tabata, Y. : A novel procedure for gingival augmentation using tissue-engineered graft. American Academy of Periodontology 2006 Annual Meeting (2006.9.16-19. San Diego)

北郷明成: 細胞成長因子のドラックデリバリーと骨再生. 第 1 回日本歯科大学 歯科再生医療ミーティング (2006.10.26. 東京)

北郷明成, 澤田育典, 虫本浩三, 森田章介, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子徐放システムを用いた sinus augmentation. 第 28 回日本バイオマテリアル学会 (2006.11.27-28. 東京)

上田寛樹, 福田正順, 山本雅哉, 中村達雄, 田畑泰彦: 熱脱水架橋コラーゲンスポンジとトランスフォーミング増殖因子 B1 との相互作用. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

上田寛樹: 細胞増殖因子徐放性足場材料を用いた骨修復と, 細胞親和性の影響. 第 8 回 COE 若手研究者発表会 (2006.11.20. 京都)

Thakor DK, Matsuka Y, Nishimura I, Meyer E, Spigelman I. NaV1.8 immunoreactivity and steady-state mRNA levels are peripherally upregulated after sciatic nerve entrapment injury. Society for Neuroscience Annual Meeting (2006.10.14-18. Atlanta)

Thakor DK. Possibility of Neural Engineering for Neural Repair. 11th International Dental Congress on Modern Pain Control (2006.10.4-7. Yokohama)

井上幸子, 大谷義昭, 平野義明, 田畑泰彦: 細胞接着ペプチド RGDS 固定化表面への脂肪前駆細胞の接着. 第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5.24-26. 名古屋)

井上幸子, 田畑泰彦: ヒト脂肪前駆細胞の増殖と脂肪分化に与える足場材料の官能基の影響. 第 27 回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)

井上幸子, 田畑泰彦: ヒト脂肪前駆細胞の増殖と脂肪分化に与える足場材料表面の官能基の影響. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

井上幸子, 飯田慶美, 平野義明, 田畑泰彦: 細胞接着ペプチド RGDS 固定化表面への脂肪前駆細胞の接着と伸展. 第 28 回日本バイオマテリアル学会 (2006.11.27-28. 東京)

- 木村 祐, 谷川麻世, 石黒智之, 深野兼司, 田畑泰彦: 電子線架橋による塩基性線維芽細胞増殖因子徐放体の作製とその血管新生効果. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 木村 祐, 野一尚子, 稲本 俊, 田畑泰彦: コラーゲンスポンジと徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いた脂肪組織の in situ 再生誘導. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 木村 祐, 辻和香子, 山城大泰, 稲本 俊, 田畑泰彦: 徐放化 bFGF とコラーゲンスポンジを用いたウサギ脂肪組織の in situ 再生誘導. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 木村 祐, 辻和香子, 稲本 俊, 田畑泰彦: 種々の生体内吸収性材料を用いた脂肪組織の再生誘導. 第 55 回高分子討論会(2006.9.20-22. 富山)
- 木村 祐, 宮崎伸彦, 林 直樹, 大鶴 聡, 玉井克人, 金田安史, 田畑泰彦: 骨形成因子(BMP-2)徐放体を用いた骨組織再生誘導における骨髄由来細胞の役割. 第28回日本バイオマテリアル学会大会(2006.11.27-28. 東京)
- Liu, J., Yamamoto, M., Yamada, M., Ohta, S., Sonoda, A., Nitta, N., Murata, K., and Tabata, Y.: Preparation of a novel photosensitizer available for both photodynamic therapy and magnetic resonance imaging. 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. (2006.7.22-26. Vienna)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 分子サイズと表面電位の異なる細胞ラベリングのための酸化鉄ナノ粒子の作製. 第 45 回日本生体医工学会(2006.5.15-17. 博多)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 分子サイズと表面電位の異なる酸化鉄ナノ粒子の骨髄間葉系幹細胞への導入. 第 1 回日本分子イメージング学会(2006.5.23-24. 京都)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 骨髄間葉系幹細胞への取り込みに与える酸化鉄ナノ粒子の分子サイズと表面電位の影響. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 城潤一郎, 永根健太郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 異なるアミノ基をもつデキストランを用いた遺伝子導入. 第 22 回 DDS 学会(2006.7.7-8. 東京)
- 城潤一郎, 岡崎有道, 田畑泰彦: 細胞培養方法を工夫したスぺルミン導入プルランによる骨髄間葉系幹細胞への遺伝子導入. 第 35 回医用高分子シンポジウム(2006.8.1-2. 東京)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 骨髄間葉系幹細胞ラベリングのための分子サイズと表面電位の異なる酸化鉄ナノ粒子の作製. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 酸化鉄ナノスフェアを含むゼラチン粒子の作製と分解挙動. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会(2006.11.27-28. 東京)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 分子サイズと表面電位の異なる酸化鉄ナノ粒子の細胞への取り込み. 2006 KIPS 若手高分子シンポジウム(2006.12.1. 京都)
- 高本智紹, 市戸義久, 今村正明, 田畑泰彦: バイオリアクタを用いた繊維強化コラーゲンスポンジ内での骨髄間葉系幹細胞の増殖. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 高本智紹, 田畑泰彦: 生体吸収性繊維強化コラーゲンスポンジ内における骨髄間葉系幹細胞の培養. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 高本智紹, 田畑泰彦: 幹細胞培養のためのコラーゲンスポンジの生体吸収性繊維による強化. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 高本智紹, 田畑泰彦: 繊維強化スポンジ内で旋回培養された骨髄間葉系幹細胞の骨分化誘導. 第 28 回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 岡空高広, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: カチオン化多糖を用いたリバーストランスフェクション法

- によるマクロファージへの遺伝子導入. 第9回日本組織工学会(2006.9.7. 京都)
- 竹越 稔, 山本雅哉, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子グラジエント化足場材料の作製. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 竹越 稔, 山本雅哉, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子グラジエント化足場材料の作製. 第28回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 小川敏弘, 高本智紹, 田畑泰彦: 幹細胞の旋回培養のためのゼラチン粒子の作製. 第52回高分子研究発表会(2006.7.21. 神戸)
- 小川敏弘, 高本智紹, 田畑泰彦: 幹細胞の旋回培養のためのゼラチン粒子の作製. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 永根健太郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 遺伝子導入キャリアとしての異なるカチオン性多糖の作製. 第52回高分子研究発表会(2006.7.21. 神戸)
- 永根健太郎, 城潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: カチオン化デキストランの遺伝子導入活性に与える導入アミノ基タイプの影響. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 膀胱肥大時における bFGF 作用機序の解明. 第94回日本泌尿器科学会総会(2006.4.13. 福岡)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 膀胱平滑筋に対する bFGF 作用機序の解明. 第3回泌尿器科再生再建研究会(2006.6.3. 札幌)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 膀胱肥大時における bFGF 作用機序の解明. 第27回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- Imamura, M., Kanatani, I., Kanematsu, A., Yamamoto, S., Tabata, Y., Ogawa, O.: High expression of basic fibroblast growth factor in bladder hypertrophy secondary to bladder outlet obstruction. 8th Asian Congress of Urology (2006.8.25. Bali)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 下部尿路通過障害に伴う膀胱肥大化における bFGF 作用機序. 第13回排尿機能学会(2006.9.8. 東京)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 下部尿路通過障害に伴う膀胱肥大化における bFGF 作用機序. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8 京都)
- 金谷 勲, 今村正明, 小川 修, 兼松明弘, 山本新吾, 稲継泰之, 田畑泰彦, 筏 義人: 吸収性人工材料による尿道再生. 第1回再生医療・臓器再建医学コースコロキウム(2006.4.1. 京都)
- 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入の増強. 第94回日本泌尿器科学会総会(2006.4.13. 福岡)
- 金谷 勲, 今村正明, 山本新吾, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入とその機序. 第22回日本 DDS 学会(2006.7.7-8. 東京)
- Kanatani, I., Imamura, M., Kanematsu, A., Inatsugu, Y., Yamamoto, S., Tabata, Y., Ikada, Y. and Ogawa, O. Rabbit Urethral Regeneration Using Synthetic Bioabsorbable Grafts. the 8th Asian Congress of Urology of the Urological Association of Asia (2006.8.23. Bali)
- 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスキャリアによる遺伝子導入とその機序. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 金谷 勲, 今村正明, 城潤一郎, 山本雅哉, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 多糖誘導体からなる非ウ

- イルスキャリアによる遺伝子導入とその機序. 第 65 回日本癌学会学術総会(2006.9.30. 横浜)
- 小川源太郎, 井上幸子, 城潤一郎, 田畑泰彦: BMP-2 遺伝子導入したヒト脂肪由来幹細胞の *in vitro* 骨分化誘導. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 木村雄太, 北郷明成, 黒澤 尚, 田畑泰彦: bFGF 徐放の多孔構造への骨進入促進作用. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 谷川麻世, 金井夏子, 田畑泰彦: セリシン誘導体を用いた酸化チタンの分散安定化と表面活性制御. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 岡崎有道, 高本智紹, 田畑泰彦: バイオリアクタトリバーストランスフェクション法とを用いた組織幹細胞への遺伝子導入. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 野一尚子, 木村 祐, 井上幸子, 高本智紹, 田畑泰彦: 力学強度の異なる高分子ハイドロゲル上での脂肪前駆細胞の増殖・分化. 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)
- 市戸義久, 稲継泰之, 中野貴由, 藤谷 渉, 馬越佑吉, 田畑泰彦, 三高俊広: 一軸配向性アパタイトセラミックスの *in vitro* 評価. 第 5 回日本再生医療学会総会(2006.3.8-9. 岡山)
- 市戸義久, 塩田博之, 関 康夫, 久保木芳徳, 田畑泰彦, 三高俊広: マイクロ繊維チタン不織布による bFGF 徐放と骨再生. 第 2 回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会(2006.6.22-23. 札幌)
- 市戸義久, 塩田博之, 関 康夫, 久保木芳徳, 田畑泰彦, 三高俊広: 徐放化 bFGF の組み合わせによるチタン不織布の骨再生誘導の増強. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 武本 啓, 森本尚樹, 鈴木茂彦, 平 嗣良, 富畑賢司, 木村 祐, 田畑泰彦: コラーゲン/ゼラチンスポンジにおける bFGF の徐放. 第 5 回日本再生医療学会(2006.3.8-9. 岡山)
- 武本 啓, 森本尚樹, 鈴木茂彦, 平 嗣良, 富畑賢司, 木村 祐, 田畑泰彦: bFGF 徐放からみた足場としてのコラーゲン/ゼラチンスポンジ. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 武本 啓, 森本尚樹, 鈴木茂彦, 平 嗣良, 富畑賢司, 木村 祐, 田畑泰彦: コラーゲン/ゼラチンスポンジによる bFGF の徐放. 第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会(2006.10.12-13. 埼玉)
- 中野貴由, 萩原幸司, 馬越佑吉, 明石 満, 中嶋英雄, 今里 聡, 田畑泰彦: 骨再建のための骨代替材料のナノ解析と骨質評価. 日本金属学会 2006 年春期(第 138 回)大会(2006.3.21-23. 東京)
- Nakano, T., Ishimoto, T., Umakoshi, Y., and Tabata, Y. : Variation in bone quality during bone healing process. 5th International Conference on PROCESSING & MANUFACTURING OF ADVANCED MATERIALS (THERMEC 2006). (2006.7.4-8. Vancouver)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 家兎尺骨自然治癒モデルを用いた材料学的手法による骨力学機能解析. 日本金属学会 2006 年春期(第 138 回)大会(2006.3.21-23. 東京)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 材料工学的手法による長管骨再生過程の解析. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 北郷明成, 田畑泰彦: 材料・構造パラメータによる家兎再生骨力学機能の解析. 日本金属学会 2006 年秋期(第 139 回)大会(2006.9.16-18. 新潟)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 材料・構造パラメータの分離による再生骨力学機能の解析. 第 28 回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 材質・構造パラメータによる再生硬組織の力学機能解析.

- 日本鉄鋼協会・日本金属学会関西支部材料開発研究会平成 18 年度第 3 回研究会(2006.12.22. 京都)
- 宮部さやか, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨粗鬆症ラットモデルに対する骨質評価. 日本金属学会 2006 年春期(第 138 回)大会(2006.3.21-23. 東京)
- 宮部さやか, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 材料工学的手法を用いた骨粗鬆症ラットモデルの骨質評価. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 宮部さやか, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨粗鬆症モデルラットにおける結晶学的・組織学的変化. 日本金属学会 2006 年秋期(第 139 回)大会(2006.9.16-18. 新潟)
- 李旭志, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤 悟, 小林章郎, 高岡邦夫, 田畑泰彦: 硬組織疾患モデルを用いた生体アパタイトの配向性評価. 日本金属学会 2006 年春期(第 138 回)大会(2006.3.21-23. 東京)
- 李旭志, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤 悟, 田畑泰彦: 骨配向化過程における破骨細胞の役割. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 李旭志, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤 悟, 田畑泰彦: op/op マウスモデルを用いた骨力学機能の解析. 第 28 回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 神谷正大, 佐藤恵美子, 杉田好彦, 久保勝俊, 前田初彦, 亀山洋一郎, 木下鞠彦, 高本智紹, 田畑泰彦: 顎骨再生医療における生体吸収性 scaffold: hydroxyapatite coated PGA/collagen sponge におけるラット骨髄間質細胞の増殖・分化能. 第 28 回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 澤田育典, 北郷明成, 杉本圭介, 福田あおい, 虫本浩三, 田畑泰彦, 森田章介: 塩基性線維芽細胞増殖因子徐放システムを用いた sinus augmentation に関する実験的研究. 第 51 回日本口腔外科学会(2006.10.12-13 北九州)
- 齋藤 繁, 伊藤奈穂美, 肥塚史郎, 西川光一, 後藤文夫, 田畑泰彦: 徐放化 bFGF を用いた慢性動脈閉塞症の治療. 第 3 回群馬創傷治療フォーラム(2006.7.7. 前橋)
- 佐々木謙, 黒田良祐, 石田一成, 鄭 克真, 木下恵祐, 松本知之, 美船 泰, 黒坂昌弘, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルと顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を併用した前十字靭帯再建術. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 永井浩巳, 西山耕一郎, 木村 祐, 田畑泰彦: 一側性反回神経麻痺に対する自己筋膜移植術の検討(b-FGF を浸透させたゼラチンシートを用いた試み). 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Matsuoka, Y., Nakagawa, T., Iwai, K., Endo, T., Kita, T., Kim TS., Tabata, Y., Ito, J.: Cochlea protection by local IGF-1 application using a biodegradable hydrogel. The 29th Mid Winter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology (2006.2.5-9. Maryland)
- Nakagawa, T., Endo, T., Tamura, T., Iwai, K., Okano, T., Kita, T., Higaki, M., Tabata, Y., Ito, J.: Drug delivery to the inner ear: nanoparticle, hydrogel and ex vivo gene transfer. The 11th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (2006.4.6-8. Busan)
- 中川隆之, 田畑泰彦, 遠藤 剛, 岩井浩治, 喜多知子, 金 泰秀, 伊藤壽一: ゼラチンハイドロゲルを用いた感音難聴治療. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 菊池直樹, 諸富孝彦, 北村知昭, 田畑泰彦, 寺下正道: FGF-2 徐放性ゼラチン粒子を用いた歯髄再生療法の検討. 第 124 回日本歯科保存学会(2006.5.25-26. 横浜)
- 菊池直樹, 諸富孝彦, 北村知昭, 田畑泰彦, 寺下正道: 歯髄再生療法を目的とした FGF-2 徐放性ゼラチンハイドロゲル粒子の応用. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Tazaki, J., Yamamoto, M., Tabata, Y., Akazawa, T., Hino, J., Murata, M., and Arisue, M.: BMP-2 Release and Dose-Re-

sponse Properties of New HAp. 84th IADR (2006.6.28-7.1. Brisbane)

赤澤敏之, 村田 勝, 田崎純一, 田畑泰彦, 山本雅哉, 中村勝男, 日野 純, 有末 眞, 菊地雅彦: 牛骨由来傾斜機能アパタイトの表面設計とその蛋白質吸着・徐放特性. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

田崎純一, 山本雅哉, 田畑泰彦, 赤澤敏之, 日野 純, 村田 勝, 有末 眞: 傾斜機能アパタイトにおける BMP-2 徐放特性と骨誘導特性. 第15回硬組織再生生物学会学術大会・総会(2006.9.16. 京都)

Nagae, M., Ikeda, T., Mikami, Y., Hase, H., Ozawa, H., Tabata, Y., Kawata, M., and Kubo, T. : Application of platelet-rich plasma (PRP) and biodegradable gelatinhydrogel on the intervertebral disc regeneration. The 52th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2006. 3.19-22. Chicago)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 長谷 斉, 小澤一史, 松田賢一, 坂本浩隆, 田畑泰彦, 久保俊一, 河田光博: 多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲル粒子の椎間板内投与による椎間板再生効果の組織学的検討. 第111回日本解剖学会総会・全国学術集会(2006.3.29-31. 相模原)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 長谷 斉, 河田光博, 田畑泰彦, 久保俊一: 多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲル粒子の変性椎間板内投与による治療効果の検討. 第35回日本脊椎脊髄病学会(2006.4.21-22. 東京)

長江将輝, 池田 巧, 澤村和秀, 三上靖夫, 長谷 斉, 久保俊一, 田畑泰彦: 多血小板血漿とゼラチンハイドロゲル粒子を用いた椎間板再生. 第32回骨カルシウム代謝研究会(2006.9.22. 京都)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 澤村和秀, 長谷 斉, 河田光博, 田畑泰彦, 久保俊一: 多血小板血漿とゼラチンハイドロゲル粒子を用いた椎間板変性に対する治療法の検討. 第25回日本運動器移植・再生医学研究会(2006.9.23. 東京)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 河田光博, 田畑泰彦, 久保俊一: 多血小板血漿とゼラチンハイドロゲル粒子を用いた椎間板再生法の検討. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会(2006.10.19-20. 長崎)

成田 淳, 高原政利, 伊藤和生, 浅野多聞, 福島重宣, 荻野利彦, 木村 祐, 田畑泰彦: bFGF 徐放化ナイロン糸が半月板細胞に与える影響について. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

寺岡正人, 羽藤直人, 菰渕勇人, 暁 清文, 田畑泰彦: DDS を用いた bFGF の顔面神経再生促進効果. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

丸井 晃, 田畑泰彦, 山本雅哉, 廣瀬圭一, 新井善雄, 丹原圭一, 仁科 健, 池田 義, 米田正始: bFGF タンパク徐放化ゼラチンハイドロゲルによる心臓血管外科領域での再生医療—新時代の再生医療に向けて.—第4回京大臨床心血管再生研究会(2006.2.8. 京都)

丸井 晃, 田畑泰彦, 山本雅哉, 廣瀬圭一, 新井善雄, 佐地嘉章, 島本 健, 丹原圭一, 仁科 健, 池田 義, 米田正始: bFGF 徐放による「時間的・空間的」局所血管新生—安全・低侵襲性への新たな試み—. 第36回日本心臓血管外科学会学術集会サージカル・フォーラム(2006.4.12-14. 盛岡)

丸井 晃, 田畑泰彦, 福島雅典, 山本雅哉, 小島伸介, 丹原圭一, 仁科 健, 池田 義, 米田正始: bFGF 徐放による「時間的・空間的」局所血管新生—安全・低侵襲性への新たな試み—第2回 DDS 再生医療連絡勉強会(2006.4.22. 京都)

丸井 晃, 仁科 健, 丹原圭一, 山本雅哉, 佐地嘉章, 笹橋 望, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 徐放化 bFGF を用いた臨床試験経過報告.Kyoto 新治療勉強会(2006.10.19. 京都)

丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 黄 玉紅, Bir Shyamal Chandra, 江崎二郎, 仁科 健, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放による「時間的・空間的」局所血管新生—安全・低侵襲性への新たな試み.—第47回日本脈管学会総会シンポジウム(2006.10.20-22. 神戸)

- 廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 野村卓正, 井上幸子, 池田 義, 光山正雄, 田畑泰彦, 米田正始: 外科感染症に対する新しい治療法・予防法確立に向けての研究. 第106回日本外科学会定期学術集会 (2006.3.29. 東京)
- 廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 野村卓正, 井上幸子, 池田 義, 光山正雄, 田畑泰彦, 米田正始: 新しい抗生剤徐放シートを使用したグラフト感染予防法. 第34回日本血管外科学会総会 (2006.5.11. 東京)
- Hirose, K., Marui, A., Shyamal Bir Chandra, Sakaguchi, H., Tabata, Y., Komeda, M.: Pretreatment with Sustained-release Sheet of Vancomycin to Prevent Prosthetic Graft Infection. American Society for Artificial Internal Organs 52th Annual Conference (2006.6.8. Chicago) ~
- 廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 木村 祐, 井上幸子, 山本雅哉, 池田 義, 光山正雄, 田畑泰彦, 米田正始: 組織工学を応用した感染症に対する新しい治療法・予防法に向けての研究. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)
- 廣瀬圭一, 田畑泰彦, 米田正始: 心臓血管外科領域の血管再生療法~最先端医療から小児科医療への応用~. 第5回静岡こども病院オープンセミナー (2006.10.5. 静岡)
- 廣瀬圭一, 藤田正俊, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, Huang Yuang, Shyamal Chandra BIR, 田畑泰彦, 米田正始: Combined treatment of sustained-release basic fibroblast growth factor and sarpogrelate enhances collateral blood flow effectively in rabbit hindlimb ischemia. 第2回京都アンブラグフォーラム (2006.10.6. 京都)
- Hirose, K., Ikeda, T., Marui, A., Arai, Y., Kushibiki, T., Kimura, Y., Sakaguchi, H., Huang Yuang, BIR Shyamal Chandra, Tabata, Y., Komeda, M.: Novel approach to rescue severe pulmonary hypertension (PH) with intratracheal administration of micro gelatin hydrogel microspheres incorporating basic fibroblast growth factor (bFGF). American Heart Association Scientific Sessions 2006 (AHA 79th) (2006.11.12. Chicago)
- Arai, Y., Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Yuhong Huang, Bir Shyamal Chandra, Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M.: Simultaneous Application of Prostaglandin E1 Enhances the Arteriogenesis by Sustained-release of Basic Fibroblast Growth Factor in the Rabbit Hindlimb Ischemic Model. The 55th Annual Scientific Session, American college of Cardiology (2006.3.12-14. Atlanta)
- 新井善雄, 廣瀬圭一, 丸井 晃, 阪口仁寿, 黄 玉紅, BIR Shyamal Chandra, 田畑泰彦, 米田正始: 肺高血圧症モデルに対する bFGF 徐放体の応用. 第6回心血管再生先端治療フォーラム (2006.7.1. 東京)
- Arai, Y., Fujita, M., Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Yuhong Huang, Bir Shyamal Chandra, Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M.: Combined Treatment of Sustained-release Basic Fibroblast Growth Factor and Heparin Enhances Angiogenesis in Hypercholesterolemic Mouse Hindlimb Ischemia. 第70回日本循環器学会総会 (2006.3.24-26. 名古屋)
- Arai, Y., Yuhong Huang, Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Shyamal Chandra Bir, Esaki, J., Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M.: Towards Optimal Therapeutic Angiogenesis for Critical Limb Ischemia -Determining Ideal Release Period of Basic Fibroblast Growth Factor -. American Heart Association Scientific Sessions 2006 (2006.11.12-15. Chicago)
- 新井善雄, 丸井 晃, 阪口仁寿, 黄 玉紅, Bir Shyamal Chandra, 江崎二郎, 仁科 健, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 重症下肢虚血に対する bFGF 徐放体による血管新生療法—「時間的・空間的」局所治療—. 第44回日本人工臓器学会大会 (2006.10.31-11.2. 横浜)

阪口仁寿, 丸井 晃, 田畑泰彦, 新井善雄, 佐地嘉章, 丹原圭一, 仁科 健, 池田 義, 米田正始: 重症虚血肢に対する血管新生療法—安全・低侵襲的な bFGF 徐放による局所血管新生—. 第 10 回心筋・血管新生療法研究会(2006.7.14. 福岡)

阪口仁寿, 新井善雄, 丸井 晃, 廣瀬圭一, 黄紅玉, Bir Shyamal Chandra, 江崎二郎, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 血管新生療法における徐放化 bFGF と PGE1 の併用効果. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

阪口仁寿, 仁科 健, 丸井 晃, 廣瀬圭一, 丹原圭一, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 心臓手術における胸骨切開後の自家胸骨再生療法—塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いて—. 第 44 回日本人工臓器学会大会(2006.10.31-11.2. 横浜)

Sakaguchi, H., Hirose, K., Marui, A., Arai, Y., Y., Yuhong Huang, Shyamal Chandra Bir, Esaki, J., Tabata, Y., Ikeda, T., Komeda, M. : Less Invasive but More Effective Method to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Graft Infection by Using Local Sustained Release of Vancomycin (VCM). American Heart Association Scientific Sessions 2006 (2006.11.12-15. Chicago)

Shyamal Chandra Bir, Arai, Y., Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Yuhong Huang, Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M. : Combined Treatment of Sustained-release Basic Fibroblast Growth Factor and Prostaglandin E1 Enhances the neovascularization in the rabbit Hindlimb Ischemic Model. The 14th CDB Meeting (2006.3.23 Kobe)

Shyamal Chandra Bir, Fujita, M., Hirose, K., Marui, A., Arai, Y., Sakaguchi, H., Yuhong Huang, Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M. : New Therapeutic Approach for Impaired Arteriogenesis in Diabetic Mouse Hindlimb Ischemia. American Heart Association Scientific Sessions 2006 (2006.11.12-15. Chicago)

林 雪, 丹原圭一, 榊原 裕, ゴティエ, 金光尚樹, 山本雅哉, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: Slow-release of MMP-1 plasmid DNA enhances the graft development of transplanted skeletal myoblasts in rat hearts with chronic myocardial infarction. 第 31 回日本外科系連合学会学術集会(2006.6.22-23. 金沢)

林 雪, 金光尚樹, 丹原圭一, ゴティエ, 長澤 淳, 顔培実, 木村 祐, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: Epicardial sustained release of erythropoietin may improve cardiac function in rat chronic myocardial infarction model. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

林 雪, 丹原圭一, 榊原 裕, 金光尚樹, 長澤 淳, 山本雅哉, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: Slow-release of MMP-1 plasmid DNA enhances the graft development of transplanted SMs in rat hearts with chronic myocardial infarction. 第 42 回日本移植学会総会(2006.9.7-9. 千葉)

Lin X, Matsuoka S, Jo H, Ishii T, Tambara K, Yamamoto M, Fujita M, Ikeda T, Noma A, Tabata Y, Komeda M : Control-release of MMP-1 plasmid DNA improved contractility and Na/Ca exchange of cardiomyocytes isolated from rat chronic myocardial infarction. heart. 78th American Heart Association (2006.11.12-15. Chicago)

杉本亮大, 丹原圭一, 金光尚樹, 長澤 淳, 長谷川浩二, ゴディタ・ウップール・プレマラットネ, 林 雪, 木村祐, 田畑泰彦, 米田正始: 肝細胞増殖因子徐放投与によるラット拡張型心筋症モデルの治療効果の検討—HGF の抗アポトーシス, 抗線維化作用—. 第 36 回日本心臓血管外科学会学術総会(2006.4.12-14. 盛岡)

杉本亮大, 丹原圭一, G. Premaratne, 金光尚樹, 林 雪, 長澤 淳, 柳 茂樹, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 慢性心筋梗塞ラットに対する骨格筋芽細胞移植の検討. 第 5 回再生心臓血管外科治療研究会(2006.4.12. 盛岡)

長澤 淳, 田畑泰彦, 丹原圭一, 山本雅哉, 丸井 晃, 鷹羽淨顕, 新井善雄, 池田 義, 米田正始: 心血管疾患領

- 域における塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の局所徐放投与による血管新生療法と新たな治療戦略の確立を目指してー、第27回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12、東京)
- 長澤 淳, 鷹羽淨顕, 林 雪, 金光尚樹, 丹原圭一, 山本雅哉, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 虚血性心筋症に対する外科的再生医学の応用、第11回日本冠動脈外科学会学術総会(2006.7.13-14、福岡)
- 長澤 淳, 新井善雄, 鷹羽淨顕, 金光尚樹, 丸井 晃, 丹原圭一, 山本雅哉, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 新たな治療戦略の確立を目指してー外科的手法と再生医学の融合、第54回日本心臓病学会学術集会(2006.9.25-27、鹿児島)
- 柳 茂樹, 林 雪, 丹原圭一, 長澤 淳, 木村 祐, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: ラット慢性心筋梗塞モデルに対するエリスロポイエチン局所徐放投与の有効性の検討、第4回心血管再生治療フォーラム(2006.9.30、神戸)
- 杉本亮大, 丹原圭一, 金光尚樹, 鷹羽淨顕, 長澤 淳, 丸井 晃, 山本雅哉, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 重症心血管疾患に対する再生医療の新たなアプローチ、第47回日本脈管学会総会(2006.10.20-22、神戸)
- 小玉直樹, 永田昌毅, 尾関 真, 木村祐, 北郷明成, 田畑泰彦, 高木律男: FGF-2 含浸ゼラチンハイドロゲルがもたらす歯槽骨再生現象の生物学的解析、第9回日本組織工学会(2006.9.7-8、京都)
- Y.S. Moon, 宇山 浩, 井上幸子, 田畑泰彦: ゼラチン/ポリ乳酸混合ナノファイバーの骨再生医療への応用、第55回高分子学会年次大会(2006.5.24-26、名古屋)
- Y.S. Moon, 宇山 浩, 井上幸子, 田畑泰彦: ゼラチン/ポリ乳酸混合ナノファイバーの骨再生医療への応用、第35回医用高分子シンポジウム(2006.8.1-2、東京)
- Y.S. Moon, 宇山 浩, 井上幸子, 田畑泰彦: ゼラチン/ポリ乳酸混合ナノファイバーの骨再生医療への応用、第9回日本組織工学会(2006.9.7-8、京都)
- Y.S. Moon, H. Uyama, S. Inoue, Y. Tabata : Nanofibrous Scaffold of Poly (L-lactic acid) with Gelatin for Bone Regeneration. IUPAC International Symposium on Advanced Polymers for Emerging Technologies (2006.10.10-13, Busan)
- Y.S. Moon, H. Uyama, S. Inoue, Y. Tabata : Nanofibrous Scaffold of Poly (L-lactic acid) with Gelatin for Bone Regeneration. Gratama Workshop 2006 (2006.10.19-21, Awaji)
- Y.S. Moon, 宇山 浩, 井上幸子, 田畑泰彦: ゼラチン/ポリ乳酸混合ナノファイバーの骨再生医療への応用、第28回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28、東京)
- 園田明永, 新田哲久, 大田信一, 瀬古安由美, 城潤一郎, 森田将史, 森川茂廣, 犬伏俊郎, 田畑泰彦, 高橋雅士, 村田喜代史: MRI 下薬物動態評価手段としての造影シスプラチン製剤の開発(第一報)、第54回日本磁気共鳴医学会大会(2006.9.14-16、つくば)
- 楠原廣久, 磯貝典孝, 草田朗子, 和田仁孝, 森 廣政, 松永吉真, 上石 弘, 田畑泰彦: 指尖部切断再接着における除法化 basic fibroblast growth factor の有用性、第49回日本形成外科学会(2006.4.12、岡山)
- 望月祐一, 磯貝典孝, 草田朗子, 田畑泰彦, 筏 義人: EMP-2 除放ゼラチンハイドロゲルシートの有用性ー眼窩床骨折モデルへの応用ー、第15回日本形成外科学会基礎学術集会(2006.10.12、埼玉)
- Ishida, K., Kuroda, R., Tabata, Y., Hokugo, A., Sasaki, K., Miwa, M., Sakai, Y., and Kurosaka, M. : Platelet-Rich Plasma with Biodegradable Gelatin Hydrogel Promotes Rabbit Meniscal Tissue Regeneration. 6th ICRS Symposium (2006.1.8-11, Sandiego)
- Ishida, K., Kuroda, R., Miwa, M., Sakai, Y., Tabata, Y., Hokugo, A., Kawamoto, T., Sasaki, K., and Kurosaka, M. :

- Platelet-Rich Plasma with Biodegradable Gelatin Hydrogel Promotes Rabbit Meniscal Tissue Regeneration. 52th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (2006.3.19-22. Chicago)
- Ishida, K., Kuroda, R., Tabata, Y., Hokugo, A., Sasaki, K., Miwa, M., Sakai, Y., and Kurosaka, M. : Platelet-Rich Plasma with Biodegradable Gelatin Hydrogel Promotes Rabbit Meniscal Tissue Regeneration. 12th ESSKA 2000 Congress (2006.5.24-27. Innsbruck)
- 石田一成, 黒田良祐, 佐々木謙, 松本知之, 鄭 克真, 美船 泰, 三輪雅彦, 田畑泰彦, 黒坂昌弘: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の局所徐放投与による骨再生. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 佐々木謙, 黒田良祐, 石田一成, 鄭 克真, 木下恵祐, 松本知之, 美船 泰, 黒坂昌弘, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルと顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を併用した前十字靱帯再建術. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 黒田良祐, 石田一成, 佐々木謙, 藤岡宏幸, 中山潤一, 久保晴司, 三輪雅彦, 黒坂昌弘, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを利用した運動器再生に関する実験的研究. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会(2006.10.19-20. 長崎)
- 松本剛一, 櫛引俊宏, 木下鞠彦, 久保田英朗, 田畑泰彦: カチオンゼラチンを用いた VEGF RNA 干渉による扁平上皮癌の遺伝子治療. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 神谷正大, 佐藤恵美子, 杉田好彦, 久保勝俊, 前田初彦, 亀山洋一郎, 木下鞠彦, 高本智紹, 田畑泰彦: 顎骨再生医療における生体吸収性 scaffold : hydroxyapatite coated PGA / collagen sponge におけるラット骨髄間質細胞の増殖・分化能. 第28回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 夏 志銀, 阿部克成, 古巣 朗, 宮崎正信, 小畑陽子, 友重龍治, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: カチオン化ゼラチン粒子(CGM)を用いた siRNA 導入の試み HSP47siRNA 投与による腎間質線維化抑制効果の検討. 第21回長崎 DDS 研究会(2006.12.8. 長崎)
- 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 古巣 朗, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 秋山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入マイクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Zhiyin Xia, Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S. : HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres (CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO). 第48回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会(2006.12.2. 長崎)
- Ishii, K., Ninomiya, Y., Takegoshi, M., Kushibiki, T., Yoshihashi-Suzuki, S., Yamamoto, M., Tabata, Y., and Awazu K. : Laser-dephosphorylation of phosphogelatin and its indirect quantitative analysis using FT-IR. Photonics WEST BIOS 2006. (2006.1.21-26. San Jose)
- 石井克典, 二宮賀久, 竹越 稯, 櫛引俊宏, 鈴木一吉橋幸子, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: 赤外分光による生体材料の非破壊計測法. 第5回日本再生医療学会総会(2006.3.8-9. 岡山)
- 石井克典, 二宮賀久, 竹越 稯, 櫛引俊宏, 鈴木一吉橋幸子, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: 赤外分光的手法を用いた細胞・組織・生体材料の非破壊計測. 第45回日本生体医工学会大会(2006.5.15-17. 福岡)
- 二宮賀久, 石井克典, 竹越 稯, 櫛引俊宏, 鈴木一吉橋幸子, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: 赤外分光による生体軟組織材料の間接定量解析. 第45回日本生体医工学会大会(2006.5.15-17. 福岡)

- 二宮賀久, 石井克典, 竹越 稔, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: 骨結合組織再生材料としてのリン酸化ゼラチンシートへのカルシウム沈着に関する検討. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 神谷正大, 佐藤恵美子, 杉田好彦, 久保勝俊, 前田初彦, 亀山洋一郎, 木下鞠彦, 高本智紹, 田畑泰彦: 顎骨再生医療における生体吸収性 scaffold: hydroxyapatite coated PGA / collagen sponge におけるラット骨髄間質細胞の増殖・分化能. 第28回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- Kobayashi, H., Minatoguchi, S., Bao Narentuoya, Yasuda, S., Misao, Y., Onogi, H., Arai, M., Uno, Y., Takemura, G., Fujiwara, T., Tabata, Y., Fujiwara, H.: Drug delivery system using erythropoietin gelatin hydrogel sheet decreases myocardial infarct size and improves left ventricular function and remodeling in rabbits. 第70回記念日本循環器学会総会・学術集会(2006.3.24-26. 名古屋)
- Kobayashi, H., Minatoguchi, S., Bao Narentuoya, Yasuda, S., Misao, Y., Onogi, H., Arai, M., Uno, Y., Takemura, G., Fujiwara, T., Tabata, Y., Fujiwara, H.: Drug delivery system using erythropoietin gelatin hydrogel sheet protects the heart against ischemia-reperfusion injury in Rabbits. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Kobayashi, H., Minatoguchi, S., Bao Narentuoya, Yasuda, S., Misao, Y., Onogi, H., Arai, M., Uno, Y., Takemura, G., Fujiwara, T., Tabata, Y., Fujiwara, H.: New drug delivery system using an erythropoietin gelatin hydrogel sheet protects the heart selectively against myocardial infarction through angiogenesis. 第10回日本心不全学会(2006.10.13-15. 東京)
- Kobayashi, H., Minatoguchi, S., Bao Narentuoya, Yasuda, S., Misao, Y., Onogi, H., Arai, M., Uno, Y., Takemura, G., Fujiwara, T., Tabata, Y., Fujiwara, H.: Drug delivery system using an erythropoietin gelatin hydrogel sheet decreases myocardial infarct size and improves left ventricular function and remodeling in rabbits. 医科学応用研究財団による国際交流助成入賞講演(2006.11.4. 名古屋)
- Kobayashi, H., Minatoguchi, S., Bao Narentuoya, Yasuda, S., Misao, Y., Onogi, H., Arai, M., Uno, Y., Takemura, G., Fujiwara, T., Tabata, Y., Fujiwara, H.: Drug delivery system using an erythropoietin gelatin hydrogel sheet decreases myocardial infarct size and improves left ventricular function and remodeling in rabbits. American Heart Association Scientific sessions 2006(2006.11.12-15. Chicago)
- 張 性洙, 井貝 仁, 三崎伯幸, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: ポリ乳酸カプロラクトン共重合体(PLA-C)を足場としたウサギ胸腔における自己組織形成誘導の実験. 第106回日本外科学会定期学術集会(2006.3.29-31. 東京)
- 張 性洙, 井貝 仁, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: ポリ乳酸カプロラクトン共重合体(PLAC)を足場とした胸腔内への自己組織誘導と抗生剤徐放ビーズを用いた新しい膿胸の治療法に関する研究. 第23回日本呼吸器外科学会総会(2005.5.25-27. 東京)
- 張 性洙, 井貝 仁, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: ポリ乳酸カプロラクトン共重合体(PLA-C)を足場とした胸腔内への自己組織形成誘導による肺切除後死腔閉鎖の試み. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 井貝 仁, 張 性洙, 後藤正司, 山本恭通, 山本雅哉, 田畑泰彦, 横見瀬裕保: Growth factor 徐放ゼラチンスポンジを用いた気管軟骨再生. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Aoki, I., Kawai, Y., Jo, J., Tabata, Y., Umeda, M., Higuchi, T., Afonso C Silva.: Applications of Manganese-enhanced MRI for Molecular / Cellular Imaging. International session, The 34th Japanese society for magnetic resonance in medicine. (2006.9. Tsukuba)

- Aoki, I., Kawai, Y., Jo, J., Tabata, Y., Umeda, M., Higuchi, T., Afonso C Silva., Tanaka, C. : Improving contrast of iron oxide based cell labeling with manganese-enhanced MRI. Proceedings of the international society for magnetic resonance in medicine, Fourteenth scientific meeting and exhibition. (2006.5.6-12. Seattle)
- Aoki, I., Kawai, Y., Jo, J., Tabata, Y., Umeda, M., Higuchi, T., Afonso C Silva., Tanaka, C. : Manganese-Enhanced MRI for Detection of Iron Oxide-Based Contrast Agents. The fifth annual meeting of the society for molecular imaging (2006.8. Hawaii)
- 青木伊知男, 河合裕子, 城潤一郎, 田畑泰彦, 樋口敏宏, Afonso C Silva, 田中忠蔵, マンガン増感法を使用した酸化鉄細胞標識のためのコントラスト増強法について. 日本分子イメージング学会 設立総会(2006.5. 京都)
- 西下直希, 平野義明, 田畑泰彦, 岡 勝仁: ペプチドの β -シート構造を利用した細胞接着性足場材料の合成と機能評価. 第 35 回医用高分子シンポジウム(2006.8.1-2. 東京)
- 西下直希, 宮澤光博, 森本佳孝, 田畑泰彦, 平野義明: RGDS ペプチドをツールとした組織工学用足場材料の分子設計. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 西下直希, 田畑泰彦, 岡 勝仁, 平野義明: 細胞接着性ペプチドと β -シート構造を利用した足場材料の構築. 第 28 回バイオマテリアル学会(2006.11.27-28. 東京)
- 坪光雄介, 小林直彦, 田畑泰彦, 岡空高広, 吉田康太郎, 中野滋文, 福嶋博道, 中野信行, 本多勇晴, 大野智之, 松岡博昭: 心筋梗塞モデルにおける徐放化 bFGF と G-CSF 併用による心筋再生治療の検討. 第 5 回循環器再生医療研究会(2006.6.10. 東京)
- Inoue, A., Arai, Y., Takahashi, K A., Tonomura, H., Sakao, K., Saito, M., Fujita, S., Tabata, Y., Kushibiki, T., Kubo, T. : The therapeutic effects of gelatin hydrogel-basic fibroblast growth factor system on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. 52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2006.3.19-22. Chicago)
- 齊藤正純, 高橋謙治, 新井祐志, 井上敦夫, 外村 仁, 阪尾 敬, 田畑泰彦, 久保俊一: 線維芽細胞増殖因子徐放化を用いた家兎変形性関節症モデルに対する治療効果の検討. 第 19 回日本軟骨代謝学会(2006.3.3-4. 横浜)
- Miyoshi, M., Kawazoe, T., Igawa, H., H., Tabata, Y., Ikada, Y., Suzuki, S. : Effects of bFGF incorporated into a gelatin sheet on wound healing. The 8th KOREA-JAPAN Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (2006.6.1-3. Jeju)
- 菊池 剛, 浅海浩二, 三谷 茂, 尾崎敏文, 久保田聡, 河田かずみ, 滝川正春, 田畑泰彦: ラット大腿骨骨欠損における CTGF/CCN2 の効果. 第 24 回日本骨代謝学会学術集会(2006.7.7. 東京)
- 久保田聡, 椋代義樹, 菊池 剛, 大野充昭, 川木晴美, 柳田剛志, 西田 崇, 田畑泰彦, 窪木拓男, 滝川正春: CCN ファミリータンパク質の内軟骨性骨化制御機構と骨・軟骨再生作用. 第 24 回日本骨代謝学会シンポジウム硬組織再生研究の最前線(2006.7.7. 東京)
- 草薨実穂, 眞田順一郎, 扇 尚弘, 高松繁行, 松井 修, 田畑泰彦, 木村 祐: 線維芽細胞増殖因子溶出型ハイドロゲル化ステントグラフト開発に関する基礎的研究—第一報—. 第 35 回日本 IVR 学会総会(2006.5.18-20. 大阪)
- 草薨実穂, 眞田順一郎, 扇 尚弘, 高松繁行, 鐘 紅珊, 松井 修, 田畑泰彦, 木村 祐: 線維芽細胞増殖因子溶出型ハイドロゲル化ステントグラフト開発における基礎的検討. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 喜多かおる, 林 博文, 逢坂公人, 渡辺岳志, 木村 祐, 田畑泰彦, 窪田吉信, 小川毅彦: マウス皮下における精細管再構成と精子形成再生. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

- 辻和香子, 山城大泰, 加藤大典, 田畑泰彦, 稲本 俊: 乳癌術後の欠損への充填を目的とした脂肪組織由来 stromal 細胞の増殖・分化についての検討. 第 14 回日本乳癌学会総会(2006.7.7-8. 金沢)
- 久末伸一, 加藤隆一, 小林 皇, 橋本浩平, 末富崇弘, 伊藤直樹, 田畑泰彦, 塚本泰司: 生体吸収性素材を用いた海綿体神経再生による骨盤神経節内の GFRa2 と nNOS の変化. 第 3 回泌尿器科再建再生研究会(2006.6.3. 札幌)
- 久保充彦, 今井晋二, 北村秀智, 野田桂子, 平倉 泰, 田畑泰彦, 井上幸子, 松末吉隆: 新規の CCK2/gastrin 受容体拮抗薬“AG-041R”による Drug Delivery System を用いた関節軟骨全層欠損の修復. 第 28 回日本バイオマテリアル学会(2006.12.27-28. 東京)
- 原田英光, 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 田畑泰彦, 石関清人: ヘルトヴィッヒ上皮鞘の形成メカニズムと歯根誘導技術の開発. 第 15 回硬組織再生生物学会学術大会・総会(2006.9.16. 京都)
- 奥西勝秀, 土肥 真, 藤尾圭志, 中込一之, 田中良一, 岡空高広, 関 誠, 田畑泰彦, 山本一彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)の徐放化による実験関節炎の抑制効果の検討. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 日比野直仁, 浜田佳孝, 油形公則, 安井夏生, 田畑泰彦, 木村 祐: 骨髄再建部の骨と髄の修復過程は b-FGF で増強される-bFGF 徐放担体を用いて. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 浜田佳孝, 日比野直仁, 安井夏生, 田畑泰彦, 木村 祐: 徐放化モノナイロン糸を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)による屈筋腱断裂の治療促進. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 河津 聡, 小田克彦, 田林暁一, 田畑泰彦: 薬物徐放フィルムを用いた冠動脈バイパス術補助療法の開発. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 天野史郎, 三村達哉, 内田彩子, 臼井智彦, 横尾誠一, 山上 聡, 木村 祐, 田畑泰彦: ヒト角膜実質組織幹細胞とゼラチンによる角膜実質再構築. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 林 和彦, 久保隆靖, 土井一矢, 松浦 歩, 森田晃司, 田畑泰彦, 赤川安正: 骨再生への bFGF ドラッグデリバリーシステムの応用. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 下野賢吾, 大野充昭, 大島正充, 木村 祐, Sebald, W., 洲鎌和茂, 田畑泰彦, 窪木拓男: ヘパリン結合活性を増強した遺伝子改変BMP-2を徐放するキャリアの最適化とその効果. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8 京都)
- 原口知則, 岡田健次, 真庭謙昌, 田畑泰彦, 大北 裕: bFGF 含浸ゼラチンシートによるラット静脈グラフトの至適動脈化に関する研究. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 宮本正章, 高木 元, 太良修平, 加藤浩司, 高野仁司, 安武正弘, 高野照夫, 水野博司, 田畑泰彦, 小守 忍, 多川政弘, 工藤圭介: 自己骨髄幹細胞及び徐放性 b-FGF ハイドロゲル浸透人工真皮による組織再生療法. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 工藤圭介, 宮本正章, 青木 忍, 原 康, 根津欣典, 余戸拓也, 原田恭治, 田畑泰彦, 多川政弘: 健常犬に作製した金層皮膚欠損創に対する徐放化bFGFハイドロゲルの投与効果. 第9回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 大田信一, 新田哲久, 園田明永, 田中豊彦, 高桜竜太郎, 山崎道夫, 古川 顕, 高橋雅士, 村田喜代史, 木村 祐, 田畑泰彦: シスプラチン徐放ゼラチン粒子: ウサギを用いた基礎的研究. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 堀 邦子, 外園千恵, 山崎健太, 木村 祐, 田畑泰彦, 木下 茂: 眼表面へのゼラチンハイドロゲルからの増殖因子徐放効果. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 堀 邦子, 羽室淳爾, 横井則彦, 木下 茂, 木村 祐, 田畑泰彦: 恒久的涙点閉鎖を目的とした bFGF 徐放涙点プ

ラグの試作. 第 30 回角膜カンファレンス (2006.2.9-11. 東京)

Hori, K., Sotozono, C., Yamasaki, K., Kimura, Y., Tabata, Y., Kinoshita, S. : Controlled-release of epidermal growth factor from gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, 2005 (2006.4.30-5.2. Fort Lauderdale, Florida)

2) 講演・シンポジウム

Tabata, Y. : Present Status of Biomaterials-based Regenerative Medical Therapy. 「Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006」(2006.1.8-9. Hiroshima)

田畑泰彦：生体組織工学を利用した再生医療とその循環器疾患への応用. 「神戸大学大学院医学研究科特別講義」(2006.1.23. 神戸)

田畑泰彦：再生誘導治療と生体組織工学. 「岩手医科大学歯学部歯科理工学講座特別講義」(2006.1.24. 盛岡)

田畑泰彦：再生誘導治療と生体組織工学. 「東北大学医学研究科特別講義」(2006.1.25. 仙台)

田畑泰彦：薬物送達法(DDS)の開発とその応用ー磁気 DDS への道のり. 「第 14 回ナノバイオ磁気工学専門研究会」(2006.1.31. 東京)

田畑泰彦：再生医療を支える Tissue Engineering の現状と将来. 「北海道大学皮膚科学分野特別講義」(2006.2.1. 札幌)

田畑泰彦：先端医療分野で利用可能な工学技術ー再生医療分野で活かすものづくり技術ー. 「第 3 回バイオサイエンス・バイオテクノロジー講習会」(2006.2.8. 長浜)

田畑泰彦：「再生医療」再生医療の現状とその基礎バイオ技術/再生医療が医療革新に及ぼすインパクト. 「バイオビジネススクール」(2006.2.18. 大阪)

田畑泰彦：細胞の遺伝子マニピュレーションのための医工学技術. 「医工学フォーラムー2005 年度特別学術講演会ー」(2006.2.22. 京都)

田畑泰彦：再生誘導治療(再生医療)を支えるバイオマテリアルと DDS. 「神戸薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム」(2006.2.25. 神戸)

田畑泰彦：再生医療を支える生体組織工学の最前線と今後の方向性. 「第 2 回日本褥瘡学会東北地方会」(2006.3.4. 福島)

田畑泰彦：組織工学の再生医療への応用. 感音難聴治療の新しい展開・組織工学との融合「平成 16-18 年度厚生労働省科学研究成果発表」(2006.3.5. 京都)

Tabata, Y. : Significant Role of Biomaterials and Drug Delivery System in Advanced Medical Therapy. 「Les entretiens du Carla」(2006.3.16-17. France)

田畑泰彦：先端医療を支える DDS バイオマテリアルの重要性. 「日本金属学会 2006 年春期(第 138 回)大会」(2006.3.21-23. 東京)

田畑泰彦：循環器再生医療を支える Tissue Engineering の最前線. 「第 70 回記念日本循環器学会総会・学術集会 真下記念講演」(2006.3.25. 名古屋)

田畑泰彦：生分解性高分子を用いた機能性薬物キャリアーの開発. 「日本薬学会第 126 年次」(2006.3.27-28. 仙台)

田畑泰彦：DDS(ドラッグデリバリーシステム)ー現状と未来ー. 「第 110 回日本眼科学科」(2006.4.15. 大阪)

田畑泰彦：DDS 技術を利用した再生医療. 「名古屋大学環境医学研究所 基礎医学特論」(2006.4.17. 名古屋)

田畑泰彦：工学・医学・薬学を融合した新たな医療への挑戦. 「日本化薬株式会社新研究棟開設記念講演」

(2006.4.18. 東京)

Tabata, Y. : A Reverse Transfection Technology To Genetically Engineer Stem Cells. 「World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine」(2006.4.24-28. Pittsburgh)

田畑泰彦：バイオマテリアルと DDS とを活用した再生誘導治療の実際－生体組織工学の重要性－. 「第 38 回日本結合組織学会学術大会ランチョンセミナー」(2006.5.11. 前橋)

Tabata, Y. : The Importance of Drug Delivery in Tissue Engineering. 「Nanotechnology : The Applications to Drug Delivery and Tissue Engineering Conference」(2006.5.18-19. Bangkok)

田畑泰彦：生体材料を用いた再生医療の最前線－生体組織工学の重要性－. 「第 32 回急性肝不全研究会」(2006.5.24. 京都)

Tabata, Y. : Approaches for the engineering of an all range of tissue. 「1st Marie Curie Cutting Edge Conference-New developments on polymers for tissue engineering : replacement and regeneration」(2006.6.1-5. Portugal)

田畑泰彦：人工臓器・組織再生・DDS などの最新知見. 「香川大学医学部 4 年次生講義」(2006.6.8. 高松)

Tabata, Y. : Biomaterials and DDS Technologies to Support Advanced Medical Therapy. 「Biomedical Engineering Conference」(2006.6.23-24. Taiwan)

田畑泰彦：再生医療を支える生体組織工学の最前線. 「第 13 回皮膚創傷治療フォーラム」(2006.6.24. 東京)

田畑泰彦：再生医療を実現する Tissue Engineering の実際と展望. 「第 46 回日本先天異常学会学術集会」(2006.6.29. 山形)

田畑泰彦：DDS と bFGF と再生医療. 「第 2 回 bFGF 臨床応用研究会」(2006.6.29. 津)

田畑泰彦：先端医療における生体材料の重要性. 「第 1 回医工学連携コース合宿」(2006.7.1. 大津)

田畑泰彦：生体組織工学を利用した再生医療とその循環器疾患への応用. 「神戸大学医学部特別講義」(2006.7.13. 神戸)

Tabata, Y. : Significant role of drug delivery technology in tissue engineering. 「Celebrating 30 years of Robert Langer Science」(2006.7.14-16. Boston)

Tabata, Y. : Temporomandibular Disorder and Regenerative Medicine. 「The 1st International and the 19th Annual Meeting of the Japanese Society for the Temporomandibular Joint」(2006.7.19-21. Nagoya)

Tabata, Y. : A Non-Viral Technology of Gene Transfection to Genetically Engineer Stem Cells. 「33th Annual Meeting Exposition of the Controlled Release Society」(2006.7.22-26. Austria)

Tabata, Y. : Strategies for Tissue Regeneration and Vascularization Based on Release Technology of Growth Factor. 「Advances in Tissue Engineering」(2006.8.16-19. Houston)

Tabata, Y. : Tissue regeneration therapy by DDS technology of growth factor and gene. 「7th Asian Symposium on Biomedical Materials」(2006.8.20-23. Jeju)

田畑泰彦：生体吸収性材料と DDS 技術とを利用した循環器再生誘導治療. 「第 5 回血管再生医療を語る会」(2006.9.5. 岡山)

田畑泰彦：再生誘導治療の実現へのブレークスルー. 「大会長あいさつ 第 9 回日本組織工学会」(2006.9.7-8. 京都)

Tabata, Y. : Reverse Transfection Technology and Fiber-reinforced Collagen Sponge Scaffold. 「King Chulalongkorn Medical Hospital special seminar」(2006.9.12-14. Thailand)

田畑泰彦：再生医療における材料工学の役割. 「日本金属学会 2006 年終期大会」(2006.9.17. 新潟)

田畑泰彦：サイトカインのドラッグデリバリーシステム(DDS)と先端医療への応用, 「第13回 BRM サイトカイン学術講演会」(2006.9.19. 名古屋)

Tabata, Y. : Regenerative medical therapy based on drug delivery system of biosignal molecules. 「7th France-Japan DDS Symposium. Recent Trends in Gene and Drug Delivery」(2006.9.24-27. Otsu)

田畑泰彦：バイオメディカルの新世界を拓く DDS, 「フロンティア材料セミナー」(2006.9.29. 大阪)

Tabata, Y. : Biomaterials and Drug Delivery Technology Indispensable for Regenerative Medical Therapy. 「International Symposium Biomaterials and Hamburg Macromolecular Symposium 2006」(2006.10.1-4. Hamburg)

Tabata, Y. : Tissue engineering-based regenerative medical therapy. 「GSKK seminar」(2006.10.3. Berlin)

Tabata, Y. : Tissue regeneration based on biomaterials. 「Twente University special seminar」(2006.10.5. Amsterdam)

田畑泰彦：組織工学からみた生体組織の再生誘導治療, 「京都大学再生医科学研究所学術講演会」(2006.10.11. 京都)

Tabata, Y. : Biomaterials-based tissue engineering. 「Bio Heat Korea special seminar」(2006.10.16. Seoul)

田畑泰彦：再生誘導治療を実現する再生医療材料技術, 「彩都バイオサイエンスセミナー」(2006.10.18. 彩都)

田畑泰彦：再生医療を実現する生体組織再生工学の実際と将来の方向性, 「第6回生体組織再生工学研究会」(2006.10.21. 大阪)

田畑泰彦：生体組織工学を利用した再生医療, 「第2回 北海道再生医療・先進医用工学 産学官連携共同研究プロジェクト会議」(2006.10.23-24. 札幌)

田畑泰彦：生体組織工学から見た再生医療の基礎研究と臨床研究, 「第1回日本歯科大学歯科再生医療ミーティング」(2006.10.26. 東京)

田畑泰彦：再生誘導治療のための生体組織工学の最前線と今後の方向性, 「青森再生医療セミナー」(2006.10.28. 青森)

田畑泰彦：DDS 化生体シグナル因子を利用した生体組織の再生誘導治療の最前線, 「新潟大学セミナー」(2006.11.1. 新潟)

田畑泰彦：先端医療を支えるバイオマテリアル(生体材料)と DDS の最前線, 「東京大学医療ナノテクノロジー人材養成ユニット」(2006.11.2. 東京)

田畑泰彦：医療関連特許と大学 パネルディスカッション, 「京都大学「医学領域」産学連携セミナー」(2006.11.9. 京都)

田畑泰彦：生体組織工学をベースとした再生医療, 「京都府立医科大学眼科学教室総合講義」(2006.11.14. 京都)

田畑泰彦：がん光線力学療法のための水溶性高分子修飾フラーレンの合成, 「第64回財団法人日本化学繊維研究所講演会」(2006.11.15. 京都)

Tabata, Y. : Tissue Engineering Therapy to Induce Tissue Regeneration. 「5th Asian International Symposium on Biomaterials」(2006.11.15-18. Xiamen)

田畑泰彦：再生医療のための生体組織の再生誘導技術, 「第28回心筋性検研究会」(2006.11.24. 高槻)

田畑泰彦：ドラッグデリバリーシステムの新しい概念, 「腎再生医療学術講演会」(2006.11.30. 長崎)

Tabata, Y. : Drug Delivery System-Based Tissue Engineering. 「UT Symposium on NanoBio Integration NANOBIO-TOKYO」(2006.12.4-7. Tokyo)

田畑泰彦：バイオマテリアルから見た再生医療の最前線, 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」(2006.12.7. 名古屋)

Tabata, Y. : Significance of Tissue engineering in Regenerative Medical Therapy. 「The 5th Asia-Pacific Symposium on Neural Regeneration」(2006.12.8-10. Shanghai)

田畑泰彦：サイボーグの夢を見つづけて、「芦屋川カレッジ」(2006.12.13. 芦屋)

田畑泰彦：再生医療を支えるバイオマテリアルと DDS 技術の最前線、「第 50 回日本学術会議材料工学連合講演会 特別シンポジウム」(2006.12.13. 京都)

Tabata, Y. : Polymeric Biomaterials Necessary for Advanced Medical Therapy. 「MACRO2006」(2006.12.17-20. Pune)

山本雅哉, 田畑泰彦：生体吸収性高分子からの細胞増殖因子の徐放化による生体組織再生, 「日本金属学会・鉄鋼協会 学術討論会」(2006.1.20. 名古屋)

山本雅哉, 田畑泰彦：生体組織再生のための機能性足場材料の創製, 「第 1 回次世代バイオマテリアル若手研究会」(2006.2.2. 筑波)

山本雅哉, 田畑泰彦：ドラッグデリバリーシステムを利用した慢性線維性疾患に対する内科的再生誘導治療, 「第 9 回日本組織工学会」(2006.9.7-8. 京都)

山本雅哉, 田畑泰彦：細胞増殖因子の DDS 技術と再生誘導治療, 「第 15 回硬組織再生生物学会学術大会・総会」(2006.9.16. 京都)

山本雅哉, 田畑泰彦：生体組織代替材料の開発と臨床応用, 「第 2 回 北海道再生医療・先進医用工学 産学官連携共同研究プロジェクト会議」(2006.10.23-24. 札幌)

山本雅哉：Tissue Engineering をベースとした再生誘導治療, 「第 3 回 21 世紀 COE 特任勉強会」(2006.11.24. 大阪)

山本雅哉：高分子ハイドロゲルを利用した生理活性物質の徐放化とその再生医療への応用, 「第 12 回創剤フォーラム若手シンポジウム」(2006.11.24. 川崎)

山本雅哉, 田畑泰彦：非ウイルス性遺伝子導入法の開発, 「第 9 回 次世代医療システム産業化フォーラム 2006」(2006.12.6. 京都)

組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

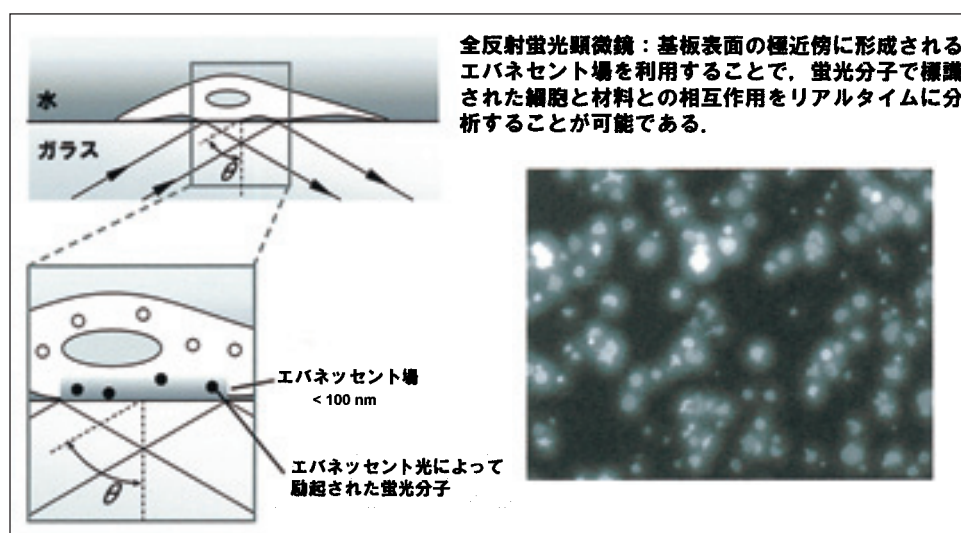
Prof. Hiroo Iwata

【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野では主に、高分子を中心とする有機材料、また、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することで、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

1. 材料-生体システム間相互作用

医用材料は、細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面で起こる分子間相互作用を通して機能を発揮します。そのため、タンパク質吸着や細胞接着のような材料-生体システム間相互作用を詳細に理解し、また、それらを厳密に制御することは重要な課題です。当研究分野では、表面プラズモン共鳴分析装置、全反射蛍光顕微鏡、共焦点レーザー走査型顕微鏡などの光学的手法を用いてこれらの課題に取り組んでいます。また、これらの基礎研究の結果をもとに高感度バイオセンシング装置の開発を行っています。



2. 組織工学的材料

細胞移植による臓器や中枢神経の再生医療に期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの免疫系からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化が有効です。当研究分野では、さらに優れた機能をもつカプセル化材料を生み出すため、材料化学的観点から研究を行っています。また、移植細胞による損傷組織の修復には、様々なシグナル分子を必要とします。そこで、細胞の機能を高度に制御できるタンパク質性材料の創出を目的として、遺伝子組換え技術を利用した組織修復材料の合理的設計に取り組んでいます。

3. 移植細胞プロセッシング技術

再生医療の実現にとって、移植用の細胞をどのように調製するかという問題は、もっとも重要な課題の一つです。当研究分野では、ドーパミン作動性神経細胞、インスリン産生細胞、造血幹細胞、神経前駆細胞などを、安全かつ高効率に作り出すための細胞分化制御・増幅技術の開発に取り組んでいます。とくに、細胞外マトリックスや細胞増殖因子のような生体分子、あるいは、ストローマ細胞のような異種の細胞を利用して、細胞の分化・増殖に適した人工環境を作り出したいと考えています。

4. 細胞アレイ

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞アレイの開発を行っています。マイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類の DNA、あるいは、RNA、タンパク質、生細胞など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です。また、細胞の形態を厳密に制御する技術と組み合わせ、新たなバイオアッセイ法へと展開する試みも行っています。細胞アレイ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待さ

れます。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are expected to exhibit diverse functions *in vitro* or *in vivo*. Fundamental and applied studies are undertaken to realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

Surface chemistry of biomedical materials

Protein adsorption and complement activation are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on protein adsorption and complement activation by artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of the complement activation. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

Polymeric materials for cell transplantation therapy

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSC further require methodological advances especially for controlling the engraftment, proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix (ECM) components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to design rationally such composite biomaterials.

Cell processing technology for regenerative medicine

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tissue-

derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells in vitro are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

Cell chips for high-throughput functional screening

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array : Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Yamazoe, H., Kobori, M., Murakami, Y., Yano, K., Satoh, M., Mizuseki, K., Sasai, Y., Iwata, H. : One-step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B₁₂ and heparin. *Cell Transplantation* **15** : 135-145 (2006).

Yamazoe, H., Iwata, H. : Efficient generation of dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells enclosed in

- hollow fibers. *Biomaterials* **27** : 4871-4880 (2006).
- Miura, S., Teramura Y., Iwata, H. : Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly (ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane, *Biomaterials* **27** : 5828-5835 (2006).
- Moriyasu K., Yamazoe H., Iwata H. : Induction dopamine releasing cells from mouse embryonic stem cells and their long-term culture. *J. Biomed. Mater. Res. A* **77**(1) : 136-147 (2006).
- Teramura Y., Arima Y., Iwata H. : Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification. *Anal. Biochem.*, **357**, 208-215 (2006)
- Arima Y., Ishii R., Hirata I., Iwata H. : Development of surface plasmon resonance imaging apparatus for high-throughput study of protein-surface interactions. *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **4**, 201-207 (2006)
- Fujimoto H., Yoshizako S., Kato K., Iwata H. : Fabrication of cell-based microarrays using micropatterned alkanethiol monolayers for the parallel silencing of specific genes by small-interfering RNA. *Bioconjugate Chem.*, **17**(6), 1404-1410 (2006).
- Yamauchi F., Koyamatsu Y., Kato K., Iwata H. : Layer-by-layer assembly of cationic lipid and plasmid DNA onto gold surface for stent-assisted gene transfer. *Biomaterials* **27** : 3497-3504 (2006).
- Kato K., Toda M., Iwata H. : Antibody arrays for quantitative immunophenotyping. *Biomaterials*, in press.
- Ibii T., Shimada H., Miura S., Fukuma E., Sato H., Iwata H. : Possibility of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells for diabetes treatment. *J. Biosci. Bioeng.* in press
- Nakajima M., Ishimuro T., Kato K., Ko I.-K., Hirata I., Arima Y., Iwata H. : Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. *Biomaterials*, in press.

2) 総 説

- 岩田博夫：表面微細加工法を用いたバイオ研究ツールの開発. *細胞工学*, **25** : 905-910 (2006)
- 加藤功一, ポストゲノム時代の細胞チップの有効性. *分子呼吸器病*, **10**(6), 468-470 (2006).
- 佐藤秀樹, 岩田博夫：サル ES 細胞からのインスリン産生細胞誘導. *再生医療*, 5 巻 1 号 (2006)
- 寺村裕治, 岩田博夫：ナノ層マイクロカプセルによる細胞移植. *医学のあゆみ*, **218**, 155-158 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 岩田博夫, 有馬祐介：Cell based assay のプラットフォーム作り. 第 66 回応用物理学会学術講演会 (2005.9.7-11. 徳島)
- 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫：成長因子キメラを担持した細胞外マトリックス表面における神経幹細胞の分化. 第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5.24-26. 名古屋)
- 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫：遺伝子工学による組織工学用ナノ分子集合体のデザイン. ナノ学会第 4 回大会 (2006.5.19-21. 京都)
- 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫：キメラ蛋白質による人工細胞外マトリックス設計の試み. 第 55 回高分子討論会 (2006.9.20-22. 富山)
- 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫：ファイバー形成能と細胞接着性をもつ人工タンパク質の創製. 第 28 回日本バイ

オマテリアル学会大会(2006.11.27-28. 東京)

Kato K., Nakajima M., Ishimuro T., Ko IK., Nakaji T., Hirata I., Arima Y., Iwata H.: Development of cell-based array technology for the selection and specification of neural stem cells, 2006 International Symposium on Biomedical Engineering (2006.12.14-16. Taiwan)

佐藤秀樹, 末盛博文, 岩田博夫: ヒト間葉系幹細胞の順化培養液を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養, 第 5 回日本再生医療学会総会(2006.3.8-9. 岡山)

佐藤秀樹, Chen Hao, 岩田博夫: in situ プロットング法によるインスリン分泌細胞のスクリーニング, 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会(2006.11.27-28, 東京)

寺村裕治, 岩田博夫: 表面プラズモン共鳴現象による血中微量マーカーのセンシング, ナノ学会第 4 回大会(2006.5.19. 京都)

寺村裕治, 岩田博夫: 表面プラズモン共鳴現象を利用した微量血中成分のセンシング, 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.25. 名古屋)

寺村裕治, 岩田博夫: ナノビーズを利用した微量血中マーカーのバイオセンシング, 第二回ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会(2006.6.23. 札幌)

寺村裕治, 岩田博夫: 表面プラズモン共鳴現象を利用した血中マーカーのバイオセンシング, 第 55 回高分子学会討論会(2006.9.21. 富山)

寺村裕治, 金田成弘, 岩田博夫: ポリビニルアルコールを用いた脾島の薄膜カプセル化の検討, 第 44 回 日本人工臓器学会大会(2006.11.1. 横浜)

三浦 傑, 寺村裕治, 岩田博夫: PEG-脂質複合体を用いた生細胞のカプセル化, 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.25. 名古屋)

有馬祐介, 藤本沙織, 岩田博夫: 官能基密度を制御した生体材料モデル表面への細胞接着, ナノ学会第 4 回大会(2006.5.19-21. 京都)

有馬祐介, 藤本沙織, 岩田博夫: 表面官能基の異なる混合自己組織化単分子膜への細胞接着, 第 55 回高分子学会年次大会(2006.5.24-26. 名古屋)

藤田 聡, 戸口田淳也, 岩田博夫: 不死化間葉系幹細胞の造血支持能と骨芽細胞への分化能の関, 第 5 回日本再生医療学会総会(2006.3.8-9. 岡山)

藤田 聡, 岩田博夫: 幹細胞定量用シリコンマイクロウェルの開発, 第 55 回高分子討論会(2006.9.20-22. 富山)

藤本裕之, 加藤功一, 岩田博夫: 遺伝子機能解析を指向した核酸担持金基板上での細胞へのエレクトロポレーション, ナノ学会第 4 回大会(2006.5.19. 京都)

藤本裕之, 加藤功一, 岩田博夫: 基板表面に担持された siRNA の電気パルスによる接着細胞への導入, 第 55 回高分子討論会(2006.9.20-22. 富山)

藤本裕之, 加藤功一, 岩田博夫: 金電極上に担持された RNA の細胞へのエレクトロポレーション, 2006 KIPS 若手高分子シンポジウム(2006.12.1. 京都)

中路 正, 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫: 金基板表面へのキメラタンパク質の配向固定およびその神経幹細胞増幅への応用, ナノ学会第 4 回大会(2006.5.19. 京都)

中路 正, 加藤功一, 佐藤秀樹, 岩田博夫: 高効率に神経幹細胞を増幅できる増殖因子配向固定化混合自己組織化単分子膜の作製, 第 55 回高分子討論会(2006.9.20-22. 富山)

戸谷貴彦, 寺村裕治, 金田成弘, 岩田博夫: ポリビニルアルコール誘導体による細胞のカプセル化, 第 52 回高分

子研究発表会(2006.7.21. 神戸)

戸谷貴彦, 寺村裕治, 金田成弘, 岩田博夫: ポリビニルアルコール誘導体による生細胞の薄膜カプセル化, 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会(2006.11.27-28. 東京)

Chen Hao, 佐藤秀樹, 岩田博夫: ニトロセルロース膜を用いたインスリン分泌細胞の免疫スクリーニング, 第 52 回高分子研究発表会(2006.7.21. 神戸)

井上祐貴, 藤本裕之, 山内文生, 加藤功一, 岩田博夫: エレクトロリパーストランスフェクションの最適化, 第 34 回医用高分子シンポジウム(2006.8.1-2. 東京)

戸田満秋, 有馬祐介, 藤本沙織, 岩田博夫: ポリエチレングリコール担持表面と血清補体との相互作用解析, 第 34 回医用高分子シンポジウム(2006.8.1-2. 東京)

宮崎寛子, 牧剛志, 加藤功一, 岩田博夫: タンパク質のマイクロパターンを利用した神経細胞の突起伸長アッセイ, 第 15 回ポリマー材料フォーラム(2006.11.16-17. 豊中)

金田成弘, 寺村裕治, 岩田博夫: チオール基を有するポリビニルアルコールを用いた細胞カプセル化の検討, 第 15 回ポリマー材料フォーラム(2006.11.16-17. 豊中)

小野大三郎, 藤田聡, 大嶋正裕, 岩田博夫: 微細加工表面に対する間葉系幹細胞の分化挙動への影響, 第 15 回ポリマー材料フォーラム(2006.11.16-17. 豊中)

山口歌奈子, 佐藤秀樹, 岩田博夫: 各種細胞外マトリクス上でのサル ES 細胞からのインスリン分泌細胞への分化誘導, 第 15 回ポリマー材料フォーラム(2006.11.16-17. 豊中)

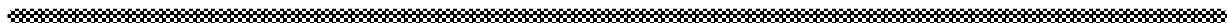
2) 講演・シンポジウム

岩田博夫: 表面微細加工の *in vitro* バイオアッセイへの展開, 「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会(2006.6.22-23. 札幌)

岩田博夫: 再生医療に向けた薄膜・表面技術, (独)日本学術振興会 薄膜第 131 委員会基礎講座「医療用薄膜」, (2006.10.3. 東京)

岩田博夫: 再生医療と材料, 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ日本バイオマテリアル学会東北地域講演会(基調講演)(2006.12.13. 仙台)

加藤功一, 金薄膜表面を利用した生体分子の平行バイオアッセイ, 第 1 回関西ナノテクノロジーシンポジウム(2006.11.21. 大阪)



生体物性学分野 Department of Mechanical Properties

客員教授 山本 伸子

Visiting Prof. Nobuko Yamamoto

【研究概要】

京都大学ナノメディシン融合教育ユニット，及び再生医科学研究所の大学院生を対象に，キヤノン(株)で開発したインクジェット法を利用した DNA チップ製造法に関し講義を行った。

This position puts me in charge of giving lectures to the graduated students of Nano-Medicine Merger Education Unit and Institute for Frontier Medical Sciences. I talked to them on DNA microarray fabrication using Ink-Jet technology developed in our company.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

K. Mori, T. Suzuki, H. Uozaki, H. Nakanishi, T. Ueda, Y. Matsuo, Y. Kodera, H. Sakamoto, M. Tatematsu, K. Mafune, N. Yamamoto, M. Sasako, T. Yoshida, M. Kaminishi, and H. Sasaki. : Detection of Minimal Gastric Cancer Cells in Peritoneal Washings by Focused Microarray Analysis with Multiple Markers : Implications for Predicting Recurrence. *Analls of Surgery* (2007) in press

小倉昌哉，山本伸子：BJ プリンター用ヘッドを用いた DNA マイクロアレイ製造方法の開発.*BIO INDUSTRY* **5** :23-28 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

山本伸子：インクジェット法による臨床用 DNA マイクロアレイの開発．高分子エレクトロニクス研究会(2006.6.6. 東京)

森 和彦，鈴木智博，深川剛生，山本伸子，松野吉宏，笹子三津留，上西紀夫，佐々木博己：胃がん腹腔細胞診への複数遺伝子による PCR 法の導入，「第 65 回日本癌学会学術総会」(2006.09.29. 横浜)

再生統御学研究部門

発生分化研究分野

Department of Development and Differentiation

分野主任 中辻 憲夫

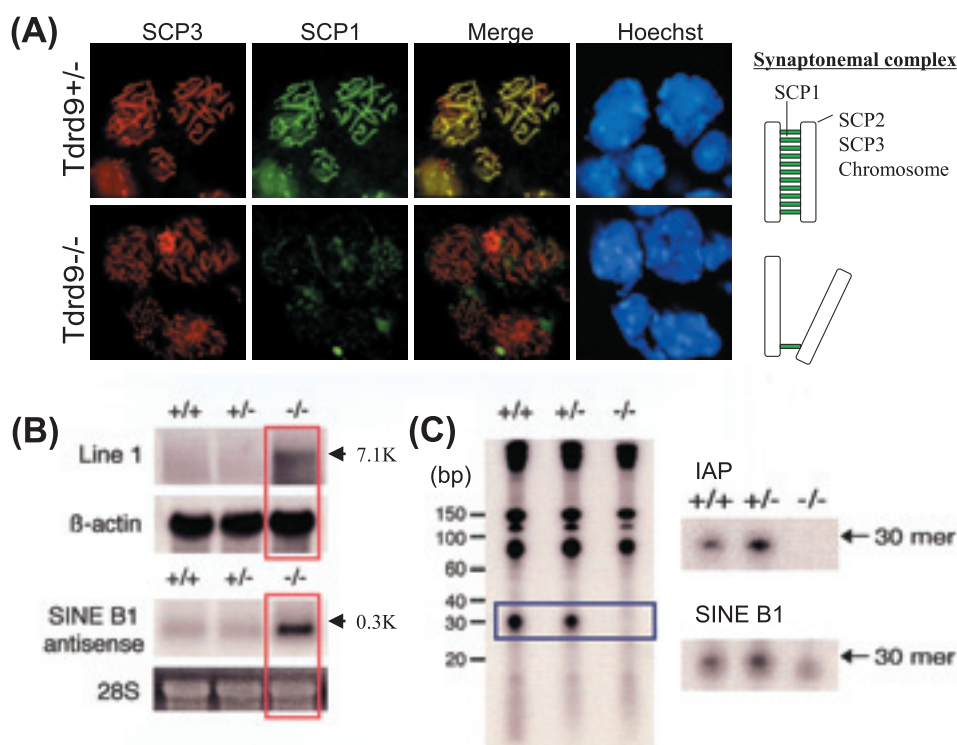
Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

マウス生殖系列細胞の発生分化機構に関する研究

哺乳類の個体発生と世代間の連続は生殖細胞と胎仔多能性幹細胞の繰り返しにより成立しており、生殖系列細胞に内在する分子システムは各種体細胞系列が分岐する際の基底状態に相当すると考えられる。生殖細胞の発生分化プロセスではゲノムの再プログラム化、個体発生能の形成、DNA 組み換え等の重要な生命現象が起こる。当研究グループでは現在、(1)生殖細胞に特徴的に観察される生殖顆粒構成分子の機能解析、および(2)減数分裂期相同遺伝子組み換え機構の研究、を進めている。

(1) これまでに Tudor ドメインの繰り返し構造を持つ TDRD1/MTR1, TDRD6, TDRD7/TRAP 蛋白質がいずれも



生殖細胞特異的な RNA helicase をコードする Tudor domain containing 9 (Tdrd9)/Spindle-E 遺伝子改変マウスは雄特異的に生殖細胞の分化異常が観察され、(A)減数分裂期相同染色体の対合異常、(B)レトロトランスポゾン mRNA の発現上昇、(C)small non-coding RNA 量の減少、等興味深い表現型が観察される。

Targeted gene disruption of Tudor domain containing 9 (Tdrd9)/Spindle-E, which encodes a germ cell specific RNA helicase, results in meiotic arrest in the male. Tdrd9 mutant mice show interesting phenotypes that include (A) defective pairing of meiotic homologous chromosomes, (B) the increased expression or stabilization of endogenous retroelement mRNAs and (C) the reduction in the amount of small non-coding RNAs expressed in the testis.

マウス生殖顆粒に特異的に局在する事を示した。このうち *Tdrd1* 遺伝子改変マウスは雄生殖細胞の成熟過程で分化異常を示す事、Tudor ドメイン単独で生殖顆粒への局在が可能だがその過剰発現は減数分裂期の異常を引き起こす事、TDRD1, 6, 7 の細胞内共局在が RNA ヘリケースである MVH により制御される事等を明らかにした。また *Tdrd1* および *Mvh* 遺伝子改変マウスはいずれも雄特異的に不妊であるが、これらの遺伝子改変マウスは雌雄共に生殖顆粒が欠損、減少する事から、雌生殖細胞の分化成熟に生殖顆粒構造が必須では無い事が明らかとなった。新たに *Tdrd9/Spindle-E* 遺伝子の同定を行い、生化学的解析および遺伝子改変マウスの作出、解析を行っている。*Tdrd9* 遺伝子改変マウスは雄生殖細胞分化に異常を示す。同蛋白質は生殖顆粒の特異的な構成分子ではないが、*Tdrd9* 遺伝子改変マウスは減数分裂期の相同染色体対合異常、ゲノムリピート配列の mRNA 発現上昇等の興味深い表現型を示す事から、現在これらの表現型が起こる分子機序についても解析を進めている。

- (2) 相同遺伝子組み換え制御機構の解明は分子、細胞生物学の重要な課題であると共により効率の良い遺伝子改変技術を創出する基盤としても重要である。これまでに我々はマウス胎仔生殖細胞が培養下で体細胞分裂から減数分裂へ自律的に移行する事を示した。現在、精原細胞由来の生殖細胞樹立株から減数分裂を誘導する詳細な実験条件を検討し、培養下における相同遺伝子組み換えの実験モデル確立を試みている。また生体精巣に対する電気穿孔法を用いて雄生殖細胞の分化段階特異的な遺伝子導入実験系を作出したので、これらの手法を用いて哺乳類減数分裂期の相同遺伝子組み換えを制御する分子基盤の解明を進める。

Mechanisms of development and differentiation of mammalian germ-line cells

The successive cycles of germ cells and pluripotent cells are fundamental for the ontogeny of individuals and the continuity of generations in mammals. The molecular mechanisms underlying the germ-line development serve as the basis for the derivation of somatic cell lineages. During the differentiation of germ cells, important and intriguing biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, the establishment of pluripotency and homologous recombination. Our current research project focuses on (1) the composition and function of nuage or germ granules, a specialized cytoplasmic structure present in the germ-line and (2) the molecular mechanisms that regulate homologous recombination in mammalian meiosis.

- (1) We have shown that TDRD1/MTR1, TDRD6 and TDRD7/TRAP, all of which contain multiple Tudor domains, specifically localize to mouse nuage. Among these, mice homozygous for a targeted mutation of *Tdrd1* show defects in male germ cell differentiation, and a single Tudor domain of TDRD1 is sufficient for directing its proper localization to nuage, while its over-expression leads to the failure of meiosis. Interestingly, the characteristic co-localization of TDRD 1, 6 and 7 to nuage is regulated downstream of *Mvh* that encodes another specific component of nuage. Gene targeted mice of *Tdrd1* and *Mvh* are male-specific sterile, but in these mutants, nuage structures are lacking or greatly reduced in both male and female germ cells. This indicates an intriguing possibility that the nuage structure is not a prerequisite for oocyte development and female fertility in mice. Recently, we identified a novel germ-line specific *Tdrd* gene, *Tdrd9/Spindle-E*, and are currently carrying out biochemical and genetic studies. Gene-targeted mice of *Tdrd9* show meiotic arrest in male germ cells with incomplete pairing of homologous chromosomes and elevated expression of repetitive elements in the genome. We are now addressing the molecular basis that underlies these interesting phenotypes.

- (2) The mechanisms of homologous recombination are important subjects of research in molecular and cell biology, and are also essential for improving the current methods of manipulating the genome. We previously showed that pri-

mordial germ cells in mouse embryos switch autonomously from mitosis to meiosis when cultured in vitro. Our current focus is to induce the meiotic transition of spermatogonial cell lines by trying various culture conditions and to devise an experimental model to study homologous recombination in vitro. We have also developed electroporation conditions of premature testes that enable differentiation-stage specific in vivo gain-of-function and loss-of-function experiments of spermatogenic genes. These experimental systems would be effective tools to address the molecular systems that regulate meiotic homologous recombination in mammals.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Adachi, K., Kawase, E., Yasuchika, K., Sumi, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H. Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, **24**, 2566-2572 (2006).
- Chuma, S., Hosokawa, M., Kitamura, K., Kasai, S., Fujioka, M., Hiyoshi, M., Takamune, K., Noce, T., Nakatsuji, N. Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15894-15899 (2006).
- Hasegawa, K., Chuma, S., Tada, T., Sakurai, T., Tamura, M., Suemori, H. and Nakatsuji, N. Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **341**, 369-375 (2006).
- Hasegawa, K., Fujioka, T., Nakamura, Y., Nakatsuji, N. and Suemori, H. A method for the selection of human embryonic stem cell sub-lines with high replating efficiency after single cell dissociation. *Stem Cells*, **24**, 2649-2660 (2006).
- Hosokawa, M., Shoji, M., Kitamura, K., Tanaka, T., Noce, T., Chuma, S., Nakatsuji, N. Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: Domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice. *Dev. Biol.*, **301**, 38-52 (2007).
- Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N., Surani, A., Tada, T. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods*, **4**, 23-25 (2007).
- Miyake, A., Saito, T., Kashiwagi, T., Ando, D., Yamamoto, A., Suzuki, T., Nakatsuji, N. and Nakatsuji, T. Cloning and pattern of expression of the shiro-uo vasa gene during embryogenesis and its roles in PGC development. *Int. J. Dev. Biol.*, **50**, 619-625 (2006).
- Nakajima, F., Tokunaga, K., Nakatsuji, N. HLA Matching Estimations in a Hypothetical Bank of Human Embryonic Stem Cell Lines in the Japanese Population for Use in Cell Transplantation Therapy. *Stem Cells*, in press.
- Shinohara, T., Kato, M., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Nakatsuji, N., Kanatsu-Shinohara, M. and Hirabayashi, M. First rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and in vitro microinsemination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 13624-13628 (2006).
- Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **345**, 926-932 (2006).
- Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M., Shinoda, G., Shiota, M., Suemori, H., Luo, HY., Chui, DH., Torii, R., Shibuya, M.,

- Nakatsuji, N. and Nakahata, T. Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*, **24**, 1348-1358 (2006).
- Umeda, K., Heike, T., Nakata-Hizume, M., Niwa, A., Arai, M., Shinoda, G., Ma, F., Suemori, H., Luo, H. Y., Chui, D. H. K., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N., Nakahata, T. Sequential analysis of alpha- and beta-globin gene expression during erythropoietic differentiation from primate embryonic stem cells. *Stem Cells*, **24**, 267-2636 (2006).
- Yasuda, S., Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Hasegawa, K., Tada, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer. *Genes Cells*, in press.
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Shoji, M., Chuma, S., Okawa, K., Kitamura, K., Nakatsuji, N.: Tudor domain containing 9 (TDRD9), a novel member of the DExH-box protein family, is a putative RNA helicase specifically expressed in germ cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006.6.18-23. Kyoto, Japan)
- 中馬新一郎, 細川美穂子, 喜多村晃一, 笠井慎也, 藤岡満喜夫, 日吉真照, 高宗和史, 野瀬俊明, 中辻憲夫: Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006.12.6-8. 名古屋)

2) 講演・シンポジウム

- Norio Nakatsuji: Establishment and manipulation of monkey and human ES cell lines for biomedical and pharmaceutical research. 第5回日本再生医療学会総会 International Symposium on Regenerative Medicine - Prospects on Human ES cell-based Therapies (2006. 3.9. 岡山)
- 中辻憲夫: サルおよびヒト ES 細胞株樹立による生物医学研究と創薬研究への応用. 第53回日本実験動物学会総会 公開シンポジウム「再生医学の現状と今後の展望」(2006.5.13. 神戸)
- Norio Nakatsuji: Establishment and manipulation of monkey and human ES cell lines. 日本組織培養学会第79回大会 International Symposium "Frontiers in Human ES Cell Research." (2006.5.24. 東京)
- 中辻憲夫: ES 細胞が持つ不思議な能力と難病治療への期待—なぜ万能細胞と呼ばれるのか. 京都大学再生医科学研究所第1回公開講演会 (2006.7.29. 京都)
- 中辻憲夫: 教育講演「ヒト ES 細胞株の樹立と医学応用—なぜ万能細胞とよばれるのか」. 日本人類遺伝学会第51回大会 (2006.10.18. 米子)
- Norio Nakatsuji: Establishment and genetical alteration of monkey and human ES cell lines for biomedical research and drug discovery. International Symposium on Stem Cells and Regenerative Medicine (2006.10.21. Taipei)
- 中辻憲夫: ES 細胞研究をめぐる国内外の動きと創薬および医療活用への展望. かわさきサイエンス&テクノロジー フォーラム 2006 (2006.11.21. 川崎)
- 中辻憲夫: ヒト ES 細胞株の樹立と再生医療および創薬への活用. 日本分子生物学会 2006 フォーラム シンポジウム「再生医療の最前線」(2006.12.7. 名古屋)
- 中馬新一郎, 中辻憲夫: Tudor domain containing 9 (TDRD9), a novel member of the DExH-box protein family, is a

putative RNA helicase specifically expressed in germ cells. 「特定領域研究 生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティックス 公開シンポジウム」(2006.12.15-16. 東京)

再生誘導研究分野 Department of Stem Cell Biology

分野主任 教授 山中 伸弥

Prof. Shinya Yamanaka

【研究概要】

初期胚から樹立される胚性幹(ES)細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であり、細胞移植療法の資源として期待されている。さらに核移植技術と組み合わせることにより拒絶反応の無い患者専用の ES 細胞を樹立できる可能性がある。しかし、ヒト胚利用に対して慎重な運用が求められている。胚を用いることなく、分化細胞から ES 細胞に類似した多能性幹細胞を直接に樹立することができたなら、倫理的問題や移植後の拒絶反応を回避することができる。そのためには分化細胞を初期化する因子の同定が重要である。ES 細胞と体細胞を融合すると分化細胞ゲノムが初期化されることから、ES 細胞に初期化因子が存在していることは確実である。私たちは ES 細胞に存在する初期化因子は、多能性の長期維持をもたらす因子とかなりの部分が重複していると考え、ES 細胞の特性維持の分子機構を解析してきた。その結果、ES 細胞における多能性の長期維持には、多能性細胞で特異的に発現している転写因子(Oct3/4, Sox2, Nanog など)に加えて、複数の癌関連遺伝子(STAT3, β カテニンなど)が関与していることが明らかになってきた。これらの因子は初期化因子の有力な候補と考えられた。

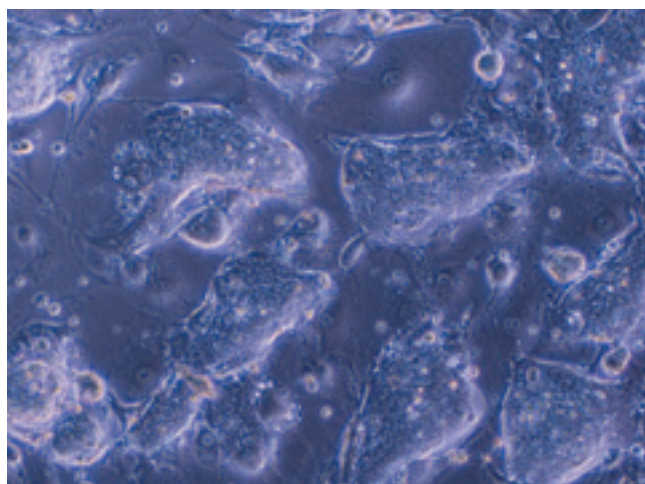


図1 【iPS】

皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞の位相差像
Phase contrast image of iPS cells derived from tail tip fibroblast

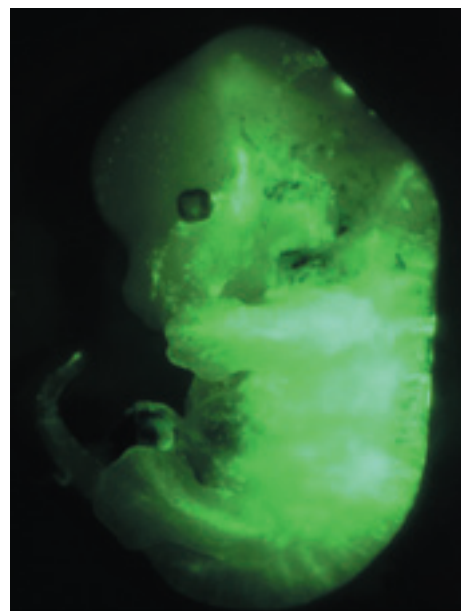


図2 【キメラマウス】

皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞の胚盤胞移植により得られたキメラ胎児
Chimeric embryos obtained by blastocyst injection of tail tip fibroblast-derived iPS cells

さらに私たちは、初期化現象を薬剤への耐性に置換する実験系を構築した。初期胚と ES 細胞で特異的に発現するが、機能的には必須では無い Fbx15 遺伝子のコーディング領域を、 β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子(β geo)と置き換えたノックインマウスを樹立した。ホモ変異 ES 細胞(Fbx15 ^{β geo/ β geo} 細胞)は高濃度(12mg/ml)の G418 に耐性であった。一方、Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウスの体細胞は G418 感受性であり、初期化が誘導され ES 類似細胞となると薬剤耐性を獲得することが期待された。

Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス由来の胎児線維芽細胞に初期化因子候補をレトロウイルスにより導入し、G418 を含む ES 細胞培地で培養した。各因子を単独で導入しても G418 耐性コロニーは出現しなかった。しかし、いくつかの因子を組み合わせることにより、耐性コロニーを再現性良く得ることができた。これらのコロニーから樹立した細胞は、形態(図 1)と増殖能において ES 細胞に類似し、Oct3/4、Nanog など ES 細胞マーカー遺伝子の発現も認められた。さらに ES 類似細胞をヌードマウスの皮下に移植すると、三胚葉系の各種組織を含む奇形腫を形成した。また胚盤胞に移植することにより、その後の胎児発生に寄与した(図 2)。これらの実験から、線維芽細胞培養から、少数の因子の組み合わせにより、ES 細胞に類似した多能性幹細胞を樹立しうることが明らかとなり、これらの細胞を人工万能幹細胞(iPS 細胞)と命名した。現在のところ、iPS 細胞がヒト体細胞からも樹立できるかは不明であるし、c-Myc やレトロウイルスを利用することから安全面での課題も多い。しかし、これらの課題を克服することができれば、ヒト胚を利用することなく、拒絶反応のない細胞移植療法を実現できる可能性がある。

Embryonic stem (ES) cells, derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to grow indefinitely while maintaining pluripotency. These properties have raised the hope that ES cells might be used to treat a host of degenerative diseases, such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and diabetes. However, clinical application of human ES cells faces difficulties regarding use of human embryos, as well as tissue rejection following implantation. One way to circumvent these issues is to generate pluripotent cells directly from somatic cells. A critical step toward this goal is the identification of factors that induce pluripotency in somatic cells.

We hypothesized that factors that played important roles in the maintenance of pluripotency of ES cells also played pivotal roles in induction of pluripotency. Long-term maintenance of pluripotency in ES cells requires transcription factors specifically expressed in pluripotent cells (e.g. Oct3/4, Sox2 and Nanog), and activation of tumor-related genes (e.g. c-Myc, β -catenin and ERas). These factors are good candidates for pluripotency-inducing factors.

To test these candidates, we have developed a system in which induction of pluripotency can be detected as marker gene expression. In this system, we utilized Fbx15 that is specifically expressed in ES cells and early embryos, but is dispensable for self-renewal of ES cells and development (1). We inserted the β geo cassette (a fusion of β -galactosidase and the neomycin resistant gene) into the mouse Fbx15 genes by homologous recombination. ES cells homozygous for β geo knock-in (Fbx15 ^{β geo/ β geo}) were resistant to an extremely high concentration of G418 (up to 12 mg/ml), whereas somatic cells derived from Fbx15 ^{β geo/ β geo} mice were sensitive to the selection. We expected that even partial induction of pluripotency would make somatic cells resistant to G418 of normal concentration (0.3 mg/ml).

We introduced the candidate genes into Fbx15 ^{β geo/ β geo} mouse embryonic fibroblasts (MEF) by retrovirus-mediated transfection and cultured them in ES cell medium containing G418. With any single factor, we did not obtain G418-resistance colonies. However, by combining four factors (Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4), we obtained multiple G418-resistant colonies. These cells showed morphology (Fig. 1) and proliferation similar to ES cells. When transplanted into nude mice, these ES-like cells produced teratomas containing various tissues of the three germ layers. Furthermore, when

transplanted into blastocysts, these cells contributed embryonic development (Fig. 2). We designated these cells iPS cells for induced pluripotent stem cells. These data demonstrated that pluripotent cells can be generated from fibroblast culture with a few defined factors.

At this moment, however, we don't know whether the same four factors can induce iPS cells from human somatic cells. Additional factors may be required in human. Once established, human iPS cells should be useful in drug discovery and toxicology. Usage of retroviral vectors and c-Myc faces serious concerns about safety of iPS cells. This issue should be resolved prior to application of human iPS cells in regenerative medicine.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Uemoto, Y., Suzuki, S., Terada, N., Ohno, N., Ohno, S., Yamanaka, S., and Komada, M. : Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J. Biol. Chem.* **in press** (2006)
- Nimura, K., Ishida, C., Koriyama, H., Hata, K., Yamanaka, S., Li, E., Ura, K., and Kaneda, Y. : Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells* **11** : 1225-1237 (2006)
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676 (2006)
- Tanaka, T.S., Lopez de Silanes, I., Sharova, L.V., Akutsu, H., Yoshikawa, T., Amano, H., Yamanaka, S., Gorospe, M., and Ko, M.S. : Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev. Growth Differ.* **48** : 381-390 (2006)
- Imamura, M., Miura, K., Iwabuchi, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T., and Yamanaka, S. : Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev. Biol.* **6** : 34 (2006)
- Amano, H., Itakura, K., Maruyama, M., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). *BMC Dev. Biol.* **6** : 11 (2006)

2) 著 書

該当無し

3) 総 説

- 山中伸弥, 高橋和利 : マウス繊維芽細胞から誘導多能性幹細胞をつくる 蛋白質核酸酵素 **51** : 2346-2351 (2006)
- 山中伸弥 : 分化多能性と核の初期化 最新医学 **61** : 2204-2208 (2006)
- 山中伸弥, 高橋和利 : 人工万能性細胞(iPS細胞)の樹立と課題 細胞工学 **25** : 1288-1289 (2006)
- 山中伸弥 : ES細胞における類腫瘍性増殖と多能性長期維持 医学のあゆみ **217** : 520-524 (2006)
- 山中伸弥 : 胚性幹細胞における分化多能性維持機構 生化学 **78** : 27-33 (2006)
- 山中伸弥 : ES細胞で特異的に発現する遺伝子群 ECAT と分化多能性 実験医学 **24** : 142-147

(2006)

Takahashi, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. : Identification of genes involved in tumor-like properties of embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* **329** : 449-458 (2006)

Okita, K., and Yamanaka, S. : Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Cur. Stem Cell Res. Ther.* **1** : 103-111 (2006)

Tokuzawa, Y., Maruyama, M., and Yamanaka, S. : Utilization of digital differential display to identify novel targets of Oct 3/4. *Methods Mol. Biol.* **329** : 223-231 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Nakagawa, M., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. : Regulatory Mechanism for Reprogramming. The American Society for Cell Biology, 46th Annual Meeting (2006.12.13. San Diego, USA)

高橋和利, 丸山昌良, 中川誠人, 山中伸弥: PI3kinase による ES 細胞の分化多能性維持機構 第2回宮崎サイエンスキャンプ(2006.2.25. 宮崎)

Takahashi, K., Hirano, T., Maruyama, M., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Role of phosphoinositide-3 kinase pathway in self-renewal of mouse embryonic stem cells. The 5th JBS Symposium (2006.3.1. 群馬)

Takahashi, K., Hirano, T., Maruyama, M., and Yamanaka, S. : Role of phosphoinositide-3 kinase pathway in self-renewal of mouse embryonic stem cells. The 2006 Keystone Symposium on Stem Cells (2006.3.31 Vancouver, Canada)

Takahashi, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts by Defined Factors. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006.6.22. Kyoto, Japan)

高橋和利, 一阪朋子, 中川誠人, 山中伸弥: Generation of Pluripotent Stem Cells from Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Joint Forum-IFMS(京大再生研), IMEG(熊大発生研), CDB(理研発生・再生研) (2006.10.10. 京都)

高橋和利: 人工万能幹細胞を樹立する因子の同定 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業(CREST)「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第3回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京)

Koyanagi, M., Takahashi, K., Okita, K., and Yamanaka, S. : Expression of miRNAs in ES cells and iPS cells. Twenty Five years of Embryonic Stem Cells in Cambridge and Official Opening of the Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research (2006.12.18. Cambridge, UK), Symposium on Stem Cells, Development and Regeneration (2006.12.19. Cambridge, UK)

Koyanagi, M. : Expression of miRNAs in ES cells and iPS cells. BBSRC Japan Partnering Award Meeting (2006.12.21. Cambridge, UK)

Okita, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Establishment of BAC-Mediated Reporter Mice for Nanog, Oct 3/4, and SOX2. 4th ISSCR Annual Meeting (2006.6.30. Toronto, Canada)

沖田圭介: 人工万能幹細胞の樹立法の改善 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業(CREST)「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第3回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京)

- Imamura, M., Shinohara, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : DNA hypermethylation of the Octamer/Sox element in the male germ line of mice. The 5th JBS Symposium (2006.3.1. 群馬)
- Imamura, M., Miura, K., Hatano, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T., and Yamanaka, S. : DNA Hypermethylation of the Octamer/SOX Elements in the Male Germ Line of Mice. 4th ISSCR Annual Meeting (2006.6.29. Toronto, Canada)
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Loss of *Shall4* Leads to Early Embryonic Lethality in Homozygous Null Mice and Neural Tube Closure Defects and Imperforate Anus in Heterozygous Embryos. The 5th JBS Symposium (2006.3.1. 群馬)
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Functional Analyses of ZN Finger Protein Sall4 Highly Expressed in Undifferentiated ES Cells and Early Embryos. 4th ISSCR Annual Meeting (2006.6.29. Toronto, Canada)
- Hirano, T., Takahashi, K., Maruyama, M., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Roles of the Phosphoinositide-3 Kinase and Canonical Wnt Pathways in Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006.6.22. Kyoto, Japan)
- 三浦恭子：人工万能幹細胞からの神経分化誘導 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST)「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第3回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京)
- 丸山昌良, 今村公紀, 伊藤宏晃, 三浦恭子, 一阪朋子, 中川誠人, 山中伸弥：転写因子とエピジェネティック修飾による Nanog 遺伝子の発現調節機構 第2回宮崎サイエンスキャンプ(2006.2.25. 宮崎)
- Maruyama, M., Imamura, M., Itoh, H., Miura, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Expression control of the Nanog gene by transcription factors and epigenetic modification. The 5th JBS Symposium (2006.3.1. 群馬)

2) 講演・シンポジウム

- 山中伸弥：ES細胞の研究の現状と展開 第9回岡山外科バイオ・レスポンス研究会(2006.1.13. 岡山)
- 山中伸弥：ES細胞の現状と展開 堺市医師会外科会学術講演会(2006.1.21. 大阪)
- 山中伸弥：核初期化による多能性幹細胞の樹立 京大臨床心血管再生研究会 第4回シンポジウム～文部科学省“再生医療の実現化プロジェクト”幹細胞治療開発領域～(2006.2.8. 京都)
- Yamanaka, S. : Pluripotency and Nuclear Reprogramming. The 2006 Keystone Symposium on Stem Cells (2006.3.31. Vancouver, Canada)
- 山中伸弥：核初期化による多能性幹細胞の樹立 第129回COEリエゾンラボ研究会(2006.4.12. 熊本)
- Yamanaka, S. : Nuclear Reprogramming without Embryos. 日本組織培養学会創立50周年記念国際シンポジウム「ヒトES細胞研究の最前線」(2006.5.24. 東京)
- Yamanaka, S. : Identification of Factors That Generate Pluripotent Stem Cells from Fibroblast Culture. The Joint Symposium of the IVR 50th Anniversary Symposium and the 2nd International Symposium of Institutes Network “Revisiting Life Science from Half Century of Virus Research” (2006.5.30. Kyoto, Japan)
- 山中伸弥：核初期化による多能性幹細胞の樹立 第33回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「再生医療と幹細胞」(2006.6.1. 東京)
- Yamanaka, S. : Pluripotency and Nuclear Reprogramming. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and

Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006.6.22 Kyoto, Japan)

Yamanaka, S. : Identification of Factors That Generate ES-like Pluripotent Cells from Fibroblast Culture. 4th ISSCR Annual Meeting (2006.6.30. Toronto, Canada)

山中伸弥：核初期化による多能製幹細胞の樹立 鳥取大学医学部生命科学科「大学院セミナー」(2006.7.11. 鳥取)

山中伸弥：核初期化による多能性幹細胞の樹立 第18回再生医療・細胞治療研究会(2006.7.28. 東京)

山中伸弥：核初期化による多能性幹細胞の樹立 第18回高遠・分子細胞生物学シンポジウム(2006.8.24. 長野)

山中伸弥：ES細胞の課題とその克服 第7回運動器科学研究会(2006.8.25. 滋賀)

山中伸弥：特定因子による多能性幹細胞の誘導 第3回六甲カンファランス(2006.8.27. 神戸)

Yamanaka, S. : Identification of factors that generate pluripotent stem cells from fibroblast culture. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Mouse Molecular Genetics (2006.8.30. New York, USA)

Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, University of California San Francisco (2006.9.5. San Francisco, USA)

山中伸弥：ES細胞研究の現状と展開 第16回日本脊椎関節炎研究会(2006.9.9. 奈良)

Takahashi, K., and Yamanaka, S. : Identification of factors that generate pluripotent stem cells from fibroblast culture. International Congress on Stem Cells (2006.9.15. Vatican City)

Yamanaka, S. : Mechanisms/pathways controlling stem cell function. Going to the roots of the stem cell controversy, Workshop 3-Hope, Hype, Honesty and Hypocrisy (2006.9.28. Voss, Norway)

山中伸弥：人工万能細胞(iPS細胞)の可能性 第5回「関西バイオの未来を考える会」セミナー(2006.10.2. 大阪)

山中伸弥：体細胞から多能性幹細胞を誘導する因子の同定 神戸大学大学院医学系研究科 第15回COE講演会(2006.10.3. 神戸)

山中伸弥：多能性幹細胞—現状と展望 ライフサイエンス基礎セミナー(2006.10.5. 東京)

山中伸弥：体細胞から多能性幹細胞を誘導する因子の同定 慶応義塾大学医学部 再生医学セミナー(2006.10.5. 東京)

山中伸弥：マウス体細胞における分化多能性の誘導 財団法人国際高等研究所シンポジウム(2006.10.7. 京都)

山中伸弥：ES細胞の機能維持と分化の分子メカニズム 愛媛大学医学部講演(2006.10.13. 愛媛)

山中伸弥：誘導多能性幹細胞(iPS細胞)の可能性 京都大学「医学領域」産学連携推進機構 第2回産学情報交流会(2006.10.20. 京都)

山中伸弥：人工万能幹細胞の可能性と課題 富士レビオ株式会社学術講演会(2006.11.2. 東京)

Yamanaka, S. : Alternative methods for deriving “Embryonic stem cells”: Induction of pluripotency in somatic cells. The National Academies, Human Embryonic Stem Cell Research Advisory Committee (2006.11.7. Washington D.C., USA)

Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures by defined factors. Seminar at Harvard Stem Cell Institute (2006.11.9. Boston, USA)

Yamanaka, S. : Identification of factors that generate pluripotent stem cells from fibroblast culture. The 19th Naito Conference(2006.11.17. 神奈川)

山中伸弥：Identification of factors that generate pluripotent stem cells from fibroblast culture. CDBセミナー(2006.11.20. 神戸)

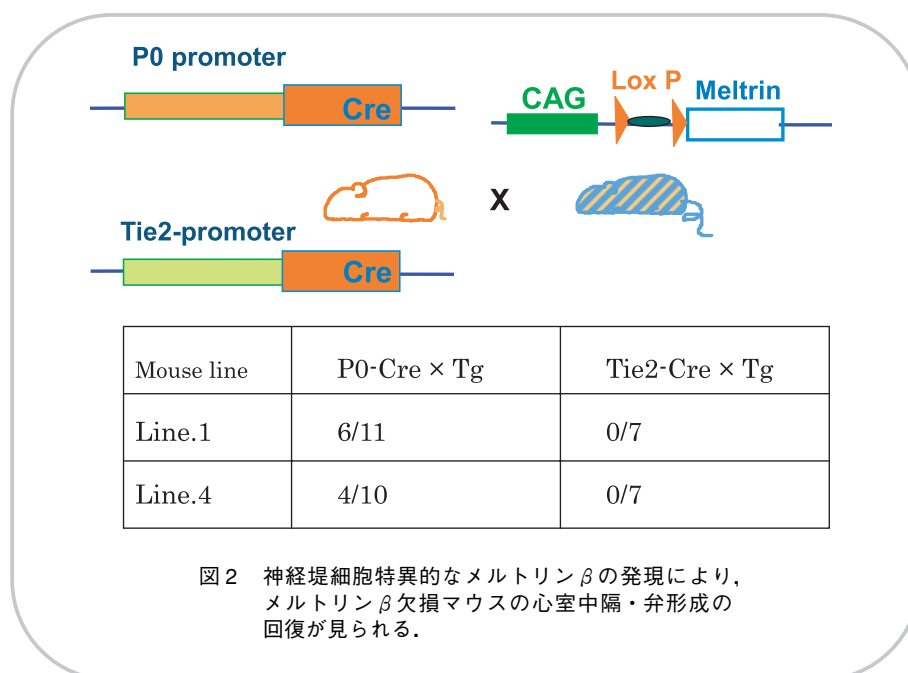
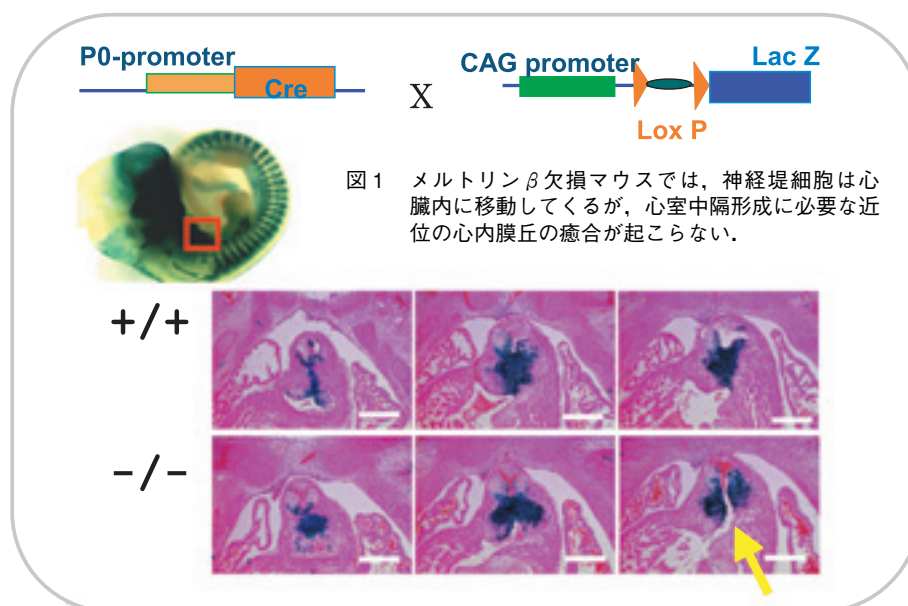
- 山中伸弥：人工万能幹(iPS)細胞の可能性と課題 兵庫県立成人病センター 学術講演会(2006.11.21. 明石)
- 山中伸弥：人工万能幹細胞(iPS細胞)の可能性と課題 神戸整形外科セミナー(2006.11.28. 神戸)
- Yamanaka, S.: Roles of the PI3 kinase pathway in ES cells. TOR-Signaling Mechanisms in the Cell Growth Regulation, Kobe University 21st Century COE Program International Symposium (2006.11.30. Kobe, Japan)
- 山中伸弥：人工万能幹(iPS)細胞の可能性と課題 近畿大学 21 世紀 COE プロジェクト「食資源動物の分子工学研究拠点」第7回国際シンポジウム(2006.12.6. 大阪)
- 山中伸弥：人工万能幹細胞の可能性と課題 日本分子生物学会 2006 フォーラム プレナリーレクチャー(2006.12.7. 名古屋)
- 山中伸弥：人工万能幹(iPS)細胞の可能性と課題 日本分子生物学会 2006 フォーラム ランチョンセミナー(2006.12.7. 名古屋)
- 山中伸弥：Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures by defined factors.日本分子生物学会 2006 フォーラム シンポジウム(2006.12.8. 名古屋)
- 山中伸弥：人工万能幹(iPS)細胞の可能性と課題 第6回循環器再生医療研究会(2006.12.9. 東京)
- 山中伸弥：真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業(CREST)「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第3回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京)
- Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures by defined factors. Symposium on Stem Cells, Development and Regeneration(2006.12.19. Cambridge, UK)
- 高橋和利, 一阪朋子, 山中伸弥：繊維芽細胞培養から ES 類似細胞を誘導する因子の同定 第4回幹細胞シンポジウム(2006.5.19. 東京)
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S.: Functional analysis of Zn finger protein Sall4 highly expressed in undifferentiated ES cells. The 5th JBS Symposium (2006.3.1. 群馬)

再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子
Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

【研究概要】

多細胞生物の個体としての調和した成長は、細胞間の接着やシグナルのやりとりなどの相互作用に依存している。これまでに発生過程において働く様々な細胞間シグナル分子や接着因子が同定されているが、それらの機能はいったいどのように制御されているのだろうか。例えば、あるシグナル分子が働く場合、シグナルの産生や応答性が時間的あるいは空間的に制御されることによって秩序ある形作りが進行するのだが、そのシグナリングのオン・オフや局所的な活性化も、転写レベルだけでなく様々な転写後制御機構により、時間的空間的チューニングを受けていると考えられる。現在、我々はそのような細胞間シグナリングの制御機構としてのプロテアーゼ制御に焦点を当て



た研究を進めている。

注目しているのは、ADAM ファミリーと呼ばれる一群の膜型プロテアーゼファミリーである。ADAM プロテアーゼは、膜型のシグナル分子やそのリセプターの切断などを介して、細胞増殖や分化に関わる細胞間シグナル分子の産生および応答性の両方を制御することがわかってきている。カドヘリンなどの接着分子も ADAM プロテアーゼによる切断制御を受けているようだ。しかし同時に、これらの膜分子の切断には ADAM ファミリーのみならず種々のプロテアーゼの関与も示唆されており、様々なプロテアーゼによる生理的に意味のある切断とその分子機構の解明が求められているのが現状である。

そのような問題意識を持って進めてきた遺伝学的アプローチを中心とする研究を紹介する。博士課程の小松紘司は、心臓形成においてメルトリン β の果たす役割を解明した。胎生期の心臓では、メルトリン β は心内膜床と呼ばれる間葉組織で発現している。この組織は心内皮細胞から上皮間葉転換によって生じる間葉細胞および心臓へと

移動してくる神経堤細胞によって構成される。まず心臓形成におけるそれらの細胞の挙動を観察するため各細胞系譜特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用した Cre リコンビネースを発現するマウス (Tie2-Cre マウス (内皮細胞系譜), P0-Cre マウス (神経堤細胞系譜)) を, Cre 依存的に LacZ を発現するトランスジェニックマウスとかけ合わせて解析を行った結果, メルトリン β は内膜組織形成後期に行われる心内膜丘の癒合に必要であることがわかった (図 1)。次に, Cre 依存的にメルトリン β を発現するトランスジェニックマウスを作製し, 各細胞系譜特異的なメルトリン β の発現による機能回復を試みたところ, 神経堤細胞特異的にメルトリン β を発現させると心室中隔欠損および一部の弁形成不全が回復した。中隔欠損・弁形成不全が, 神経堤細胞におけるメルトリン β の発現により特異的に回復することを示したことで, 心室中隔・弁形成におけるメルトリン β 及び心臓神経堤細胞の関与を遺伝学的に証明することができた (図 2)。この研究は, 未だよくわかっていない心臓形成における神経堤細胞の役割を知る上で重要な知見をもたらしたと同時に, メルトリン β の生理的基質を解明するひとつの手がかりを与えた。

(English)

Coordinated development of multi-cellular organisms depends on intercellular communications and adhesions. Our research has been focused on regulatory mechanisms of such cell-cell interactions during development, mainly those of myogenesis. Numerous intercellular signaling molecules are generated as membrane-anchored proteins, and they are subjected to proteolytic processing to liberate their extracellular domains (ectodomain shedding). Molecular bases that regulate the ectodomain shedding processes are coming into focus. Evidence suggests that ADAM family proteases are involved in the ectodomain shedding of various membrane proteins. We are currently studying roles of ADAM proteases in development or diseases, which will clarify physiological significance of ectodomain shedding mediated by ADAM proteases. We report a study on a role of Meltrin β /ADAM19 this year.

The heart is divided into four chambers by membranous septa and valves. Although evidence suggests that formation of the membranous septa requires migration of neural crest cells into the developing heart, the functional significance of these neural crest cells in the development of the endocardial cushion, an embryonic tissue that gives rise to the membranous appendages, is largely unknown. Mice defective in the protease region of Meltrin β show ventricular septal defects and defects in valve formation. In this study, by expressing Meltrin β in either endothelial or neural crest cell lineages, we showed that Meltrin β expressed in neural crest cells but not in endothelial cells was required for formation of the ventricular septum and valves. Although Meltrin β -deficient neural crest cells migrated into the heart normally, they could not properly fuse the right and left ridges of the cushion tissues in the proximal outflow tract (OT), and this led to defects in the assembly of the OT and AV cushions forming the ventricular septum. These results genetically demonstrated a critical role of cardiac neural crest cells expressing Meltrin β in triggering fusion of the proximal OT cushions and in formation of the ventricular septum.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Irie, N., Sehara-Fujisawa, A.: The vertebrate phylotypic stage and an early bilaterian-related stage in mouse embryo-

- genesis defined by genomic information. *BMC Biology*, in press
- Yokozeki, T., Wakatsuki, S., Hatsuzawa, K., Black, R.A., Wada, I., Sehara-Fujisawa, A. : Meltrin β /ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin β 1 in the Golgi Apparatus : Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells. *Genes to Cells*, in press
- Dyczynska E, Sun D, Yi H, Sehara-Fujisawa A, Blobel CP, Zolkiewska A. : Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem*. in press
- Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K. & Ishiura, S. : ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP α -secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 352(1) : 111-7. (2007)
- Kouji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Shu-ichi Yamada, Ken-ichi Yamamura, Jun-ichi Miyazaki, Pandelakis A Koni, Atsuko Sehara-Fujisawa. : Meltrin β expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart, *Developmental Biology*, in press.
- Weskamp, G., Ford, J.W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R.A., Ludwig, A., Becherer, J.D., Conrad, D.H. and Blobel, C.P. : ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *nature immunology*, ;7 (12) : 1293-1298. (2006)
- Peduto, L., Reuter, V.E., Sehara-Fujisawa, A., Shaffer, D.R., Scher, H.I., Blobel, C.P.. : ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for prostate tumor progression. *Oncogene*, 25 (39) : 5462-6. (2006)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Tomoichi Yokozeki, Shuji Wakatsuki, Kiyotaka Hatsuzawa, Black Roy, Ikuo Wada, Atsuko Sehara : Meltrin beta/ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi Apparatus : Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells, 日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来(2006.12.6. 名古屋市)
- Kouji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Shuichi Yamada, Kenichi Yamamura, Jun-ichi Miyazaki, Pandelakis A Koni, Atsuko Sehara-Fujisawa : Meltrin β expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart, 日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来(2006.12.7. 名古屋市)
- 若月修二, 小松絃司, 湯本法弘, 瀬原淳子 : 末梢神経再生過程における膜型メタロプロテアーゼメルトリン β の機能, 日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来(2006.12.7. 名古屋市)
- 若月修二, 小松絃司, 湯本法弘, 瀬原淳子 : 末梢神経再生過程における膜型メタロプロテアーゼメルトリン β の機能, CREST 研究領域「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム(2006.12.15. 東京都)

2) 講演・シンポジウム

- 瀬原淳子 : 形態形成・疾病における役割から探る ADAM プロテアーゼの機能, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「Membrane-proximal proteolysis : 膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端」(2006.2.21. 吹田市)
- 瀬原淳子 : 形態形成・病気における ADAM ファミリーの役割, Translational medicine Seminar(2006.7.9. 御殿場)

市)

瀬原淳子, 若月修二, 小松紘司, 横関智一, 宮川剛, 山村研一, 宮崎純一, 初沢清隆, 和田郁夫: 形態形成における膜型プロテアーゼメルトリン β (ADAM19) の役割と機能, シンポジウム「形態形成を制御する細胞外環境—その未知なるもの Role of extracellular environments in development and morphogenesis」(オーガナイザー: 瀬原淳子, 西脇清二), 日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来 (2006.12.6. 名古屋市)

瀬原淳子, 若月修二, 小松紘司, 横関智一, 宮川剛, 山田秀一, 山村研一, 宮崎純一, 初沢清隆, 和田郁夫: 形態形成・再生における ADAM プロテアーゼの役割: メルトリン β /ADAM19 の働きを中心に, CREST 研究領域「生物の発生・分化・再生」第 5 回公開シンポジウム (2006.12.15. 東京都)

再生免疫学分野 Department of Immunology

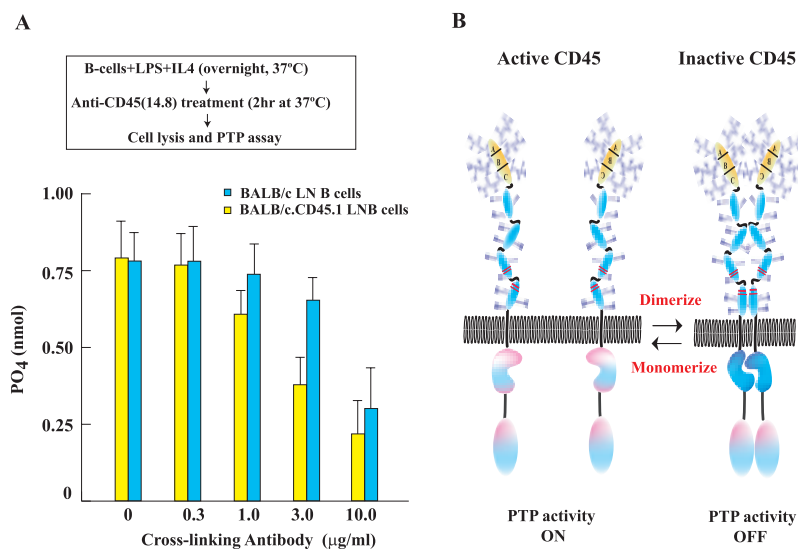
助教授 喜納 辰夫
Assoc. Prof. Tatsuo Kina

【研究概要】

本研究分野では, (1) アレルギー自然発症モデル BALB/c.CD45.1 コンジェニック・マウスにおけるアレルギー発症機構と (2) X 線照射およびアルキル化試薬 ENU による胸腺リンパ腫発症機構の解析を主なテーマとして研究を行っている。

1. BALB/c.CD45.1 コンジェニック・マウスにおける免疫異常とその分子機構

造血系細胞表面に特異的に発現される糖タンパク質 CD45 は, リン酸化チロシン特異的脱リン酸化 (PTP) 活性を有し, T および B リンパ球の機能を正・負の方向に調節していることが知られている。最近, CD45 の細胞外ドメインの変異あるいは欠失が重症免疫不全症や多発性硬化症を引き起こす例などが報告され, CD45 がヒトの病気のいろいろな側面で関係していることが示されている。C57BL/6.Ly5.1 マウスを BALB/c マウスに連続的にバッククロスして作成した BALB/c.CD45.1 コンジェニック・マウスは, CD45 遺伝子座に関して, 通常の BALB/c マウスに較べてわずかに 5 個のアミノ酸変異しか示さないが, 通常の飼育環境下で生後半年以降に高頻度で頭や背中の皮膚炎, アレルギー性結膜炎や中耳炎を発症する。これらの免疫異常は, 血中の Th2 サイトカインや IgE の上昇と時期を一致しており, SPF 環境下では発症しないことから, 環境因子による刺激が発症に関連していることが考えられた。BALB/c.CD45.1 マウスにおける免疫異常を細胞レベルで調べたところ, リンパ節において CD69 陽性の活性化型 B 細胞数が増加していることと, これらの B 細胞の Jak3 および Stat6 のチロシンリン酸化の程度が CD45.2 マウスのそれと比較して有意に高いことが判明した。また, Jak3 および Stat6 の活性化が必須とされる activation-induced cytidine deaminase や germline Ig ϵ transcript の発現も CD45.1 マウスにおいて有意に高いことが認められた。これらの結果は, CD45.1 マウスが持つ CD45 分子 (CD45.1) が, CD45.2 マウスの持つ CD45.2 分子と比較して, PTP 活性が低下している, もしくは低下しやすいことを示唆していると考えられた。マラカイト・グ



A. Decline of PTP activity of CD45 molecules of B-cells by cross-linking cell-surface CD45 with anti-CD45 Ab

B. A model for the regulation of PTP activity of CD45 (Wedge model). CD45.1 has stronger tendency to homo-dimerize as compared to CD45.2.

リン法を用いて細胞表面 CD45 分子の PTP 活性を直接測定する方法を確立して、CD45.1 と CD45.2 マウスの B 細胞の PTP 活性を測定したところ、CD45.1 マウスの B 細胞は年齢とともに PTP 活性が CD45.2 マウスに較べて有意に低下してしていることが示された。また、CD45.1 および CD45.2 マウスの B 細胞表面 CD45 分子を抗 CD45 抗体で架橋すると、CD45 分子の PTP 活性が顕著に低下することから、細胞表面 CD45 分子のダイマー形成が CD45 分子そのものの PTP 活性低下の原因になっている可能性が示された(図の A 参照)。これらの知見に基づいて、現在我々が推測している CD45 分子の活性調節の分子モデル(Wedge model)を図に示す(図の B 参照)。

今後、この分子モデルが正しいかどうかを検討すると共に、BALB/c.CD45.1 マウスを用いてアレルギー発症を抑制する治療法の確立を目指したい。

2. X線照射およびアルキル化試薬 ENU による胸腺リンパ腫発症と TCR β 鎖遺伝子組換え機構

マウス胸腺の萎縮は、種々の処置により誘導可能である。萎縮した胸腺では胸腺細胞の活発な分化・増殖がなくなり、臓器として再生する。しかし再生過程において、高頻度で異常(胸腺リンパ腫)が生じてくる。前年度からの X 線照射に加え、今年度はアルキル化試薬 ENU 処理により誘導した胸腺リンパ腫を材料にして、まず TCR β 鎖遺伝子座の構造を解析した。ENU は、主として DNA 中の塩基グアニンをアデニンに置換する突然変異誘発剤であることが知られている。ENU 処理によってマウス 51 頭に発生した胸腺リンパ腫において、TCR β 鎖遺伝子のすべての組換えを検出し、塩基配列を決定した。X 線照射で発生した胸腺リンパ腫の解析結果と比較したところ、これまでに以下のことが判明している。1. ENU 誘発胸腺リンパ腫からのみ 7 つ、TCR β 鎖 V to DJ 再構成前の分化段階の T 細胞が腫瘍化していた。2. X 線照射誘発胸腺リンパ腫においては、TCR β 鎖 V to DJ 再構成が亢進していた。しかしながら、遺伝子組換え亢進に伴い破綻することが予想された allelic exclusion は、正常 T 細胞と同様、遵守されていた。3. ENU 誘発胸腺リンパ腫においては、TCR β 鎖遺伝子に 1 塩基置換による突然変異が生じ、正常なプレ TCR 鎖を発現できなかったと推定されるものが、5 つ見つかった。以上のように、X 線あるいは ENU により誘導された胸腺リンパ腫の TCR β 鎖遺伝子組換えに関しては、明らかな違いを見出した。今後は、胸腺リンパ腫発症=再生異常に係わった機構を解析する予定である。

Our research effort focuses on two major areas. (1) Molecular and cellular mechanisms of inflammatory diseases of BALB/c.CD45.1 congenic mice. (2) Molecular mechanism of thymic lymphomagenesis in C57BL/6 mice induced by sub-lethal doses of X-ray or alkylating agent ENU.

1. Molecular and cellular mechanisms of immune disorders in BALB/c.CD45.1 congenic mice

CD45 is a leukocyte-specific glycoprotein which carries phosphotyrosine-specific phosphatase (PTP) activity and is shown to play critical roles in the regulation of T and B lymphocyte functions in both positive and negative fashions. CD45 is also known to be participated in the regulation of macrophage/granulocyte functions in various diseases. In human, it has recently been shown that minor mutations or deletions in the extracellular domain of CD45 resulted in severe combined immunodeficiency or multiple sclerosis, suggesting that CD45 is involved in various aspects of human diseases. The BALB/c.CD45.1 congenic mice, which we have recently established in our laboratory by consecutive backcrossing of C57BL/6.Ly5.1 mice to BALB/c background, carry the CD45.1 allotype of murine CD45 locus and show only five amino-acid substitutions in the extracellular domain of CD45 molecule as compared to normal BALB/c mice. Interestingly, under the conventional breeding conditions, these congenic mice frequently developed various inflammatory diseases often observed in aged human patients, such as atopic dermatitis, conjunctivitis and tympanitis. The occurrence of these diseases coincides with the elevation of concentration of serum Th2 cytokines and IgE. These diseases were not detected in mice bred under the specific pathogen-free conditions, indicating that environmental antigens are involved in the induction of these inflammatory diseases. Greater number of B cells were found in lymph nodes of CD45.1 mice as compared to CD45.2 mice, and these B cells are positive for CD69 activation antigen. Biochemical analysis indicated that Jak3 and Stat6 molecules in these B cells are highly phosphorylated as compared to B cells of CD45.2 mice. It is also shown that the expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and germline Ig ϵ transcripts is significantly higher in B cells of CD45.1 mice. These results suggest that PTP activity of CD45.1 molecules is lower than that of CD45.2 molecules. By using marachite green method, we directly compared the PTP activity of CD45 molecules of B cells in both CD45.1 and CD45.2 mice. We found that CD45 PTP activity of CD45.1 mice is decreased age-dependently. Cross-linking of cell surface CD45 molecules with anti-CD45 monoclonal antibody resulted in the decreased PTP activity in B cell (Fig.A), suggesting that the dimerisation of cell surface CD45 molecules is a possible cause of lower PTP activity of B cells in CD45.1 mice. Based on these findings, we propose a model (Wedge model) for the regulation of PTP activity of CD45 in Fig.B.

As the cause of these allergic reactions appears to be resulted from allotypic mutations introduced in CD45 molecules of BALB/c.CD45.1 mice, we think that these congenic mice provide a unique model for investigating the molecular mechanisms of immune disorders found in human patients with CD45 mutations.

2. Thymic lymphomagenesis induced by X-ray irradiation or an alkylating agent ENU and mechanism of TCR β chain gene rearrangement

Atrophy of murine thymus can be artificially caused by several elements. Normally, intensive proliferation and differentiation of thymocytes start to regenerate the thymus. However, thymic lymphomas are often observed during regeneration. We have analyzed TCR β chain gene loci in X-ray irradiation or alkylating agent ENU induced thymic lymphomas.

phomas. ENU is well known to create mainly the G to A transition in DNA. This year, we detected and sequenced all the rearranged constructs from 51 murine thymic lymphomas induced by ENU. Taken all data together, we have revealed that only seven ENU lymphomas have the DJ/DJ or germline/DJ TCR β loci, and that more TCR β genes undergo rearrangement in X-ray lymphomas and at the same time allelic exclusion is observed, and that five ENU lymphomas are estimated to have point mutations hindering formation of functional pre TCR. It is therefore apparent that X-ray and ENU have distinct effects on TCR β chain gene rearrangement. Next, we are going to analyze the molecular mechanisms of lymphomagenesis.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

Kim, J-Y., Kina, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Matsumura, K., Hyon, S-H. : Tea polyphenol inhibits allostimulation in mixed lymphocyte culture. Cell Transplant. in press.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫, 島田義也 : X線照射で誘発したマウス胸腺リンパ腫における TCR β 鎖遺伝子座の解析 : V to DJ rearrangement の亢進と allelic exclusion の遵守. 第 16 回 Kyoto T Cell Conference 第 16 回集会 (2006.6.2-3. 京都)

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫, 島田義也 : 1 頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫から検出された 2 種類以上の TCR β 鎖遺伝子座の genotypes. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006.12.6-8. 名古屋)

FUJIMOTO Shinji, KINA Tatsuo, YOKOTA Yoshifumi : Enforced expression of Id2 in murine single fetal thymic progenitors that originally generate exclusively T cells allows some of their progeny to adopt NK cell fate. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006.12.11-13. 大阪)

KINA, Tatsuo, FUJIMOTO Shinji : Immune disorders of BALB/c.CD45.1 congenic mice and the decline of PTP activity of CD45.1 molecules with age. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006.12.11-13. 大阪)

再生医学応用研究部門

組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

Prof. Junya Toguchida

【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解し、その成果にもとづいて、間葉系組織の臨床病態に対する新規治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行っている。これまで培養初期における平均テロメア長により最終倍加数を予測できること、p16 遺伝子の発現が短期的な増殖能を反映することを見出した。これらは臨床応用の際に増殖能を評価する上で有意義な情報を与えるものである。分化能の評価に関しては、我々が樹立した不死化 MSC クローンを用いてアプローチし、骨分化能を予測できる細胞表面マーカーの同定に成功した。更に脂肪・軟骨分化能を評価にも有用であることを示す知見を得ている。これらの結果は、現在一括りに取り扱われている MSC が増殖・分化能において多様な細胞の集団であることを実証するものであり、詳細な解析への鍵となるものと考えている。

2. 間葉系幹細胞の癌化監視機構の開発

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すわなり肉腫の起源細胞になりうる。実際マウスのみならずヒト MSC も特に低密度培養法により、細胞増殖を刺激する方法で培養を行った場合、染色体異常が発生することが示されており、MSC を用いた間葉系組織の再生医療の遂行に当たって無視できない状況になっている。我々は培養過程における癌化の初期変化としての p16 遺伝子のメチル化に注目し、その変異を定量的に解析する方法を開発し、実際に p16 遺伝子のメチル化が培養過程で発生し、それにより細胞の増殖能が亢進する場合があることを見出している。他の遺伝子変異解析を含めて、MSC の癌化監視機構の確立が最終目標である。

この MSC の癌化の問題は、肉腫細胞の生物学の見地から考えると、MSC 様の多分化能をもつ細胞が、いわゆる癌幹細胞として存在している可能性と関連している。実際、我々は培養肉腫細胞の中には、MSC 様あるいは神経堤幹細胞様の多分化能を持つものがあることを見出し(図 1)、これらに対する分化誘導療法の可能性を検索している。

3. MSC を用いた難治性病変への新規治療法の開発

MSC を用いた再生医療の具体例として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。まず基礎的実験として、イヌを用いて月状骨無腐性壊死モデルを作成し、自家 MSC を人工骨材料と混合した上で壊死部

に充填した。その結果、MSC 移植により、圧潰することなく十分な強度をもった月状骨が再生されることを報告した。この結果をもとに京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターにおける臨床治験を「ヒト幹細胞を用いた臨床治療研究」として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請中である。

4. 関節軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタグランジン E2(PGE2)に注目し、その関節軟骨病態への応用を検討してきた。マウス及びヒト軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験で、EP2 特異的アゴニ

ストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、この知見に基づき、家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。その結果、適切な DDS により EP2 アゴニストを供給することで軟骨再生が促進される知見が得られ、これも臨床応用が近い再生医療であると考えている。

(文責 戸口田淳也)

The major objects of our department are to understand the basic biology of growth and differentiation of mesenchymal tissues and to develop new therapeutic modalities for pathological conditions in mesenchymal tissues. Following projects are currently undertaken.

1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which reside among the bone marrow stromal cells, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. There are, however, still many fundamental features of MSC are unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine.

In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth potential, we have found that the level of p16 gene expression can predict the short-term growth potential, and the average length of telomere at the early passage can predict the number of final population doubling. These finding will provide a useful information for the evaluation of growth potential in the clinical application. To analyze the differentiation potential, we used immortalized MSC clones which we have established, and successfully isolated a cell surface marker which can predict the osteogenic differentiation potential. This marker is also useful to evaluate the adipogenic and chondrogenic differentiation potential.

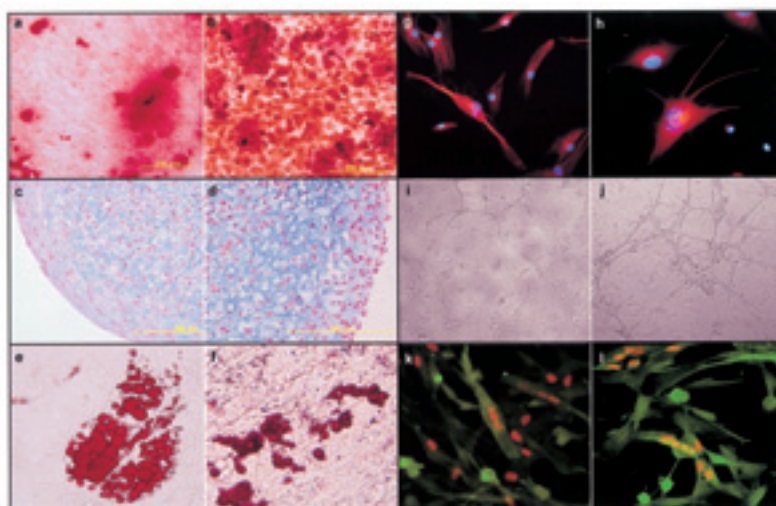


図 1. 培養骨肉腫細胞のもつ多分化能。

骨肉腫細胞株 ANOS(a, c, e, g, i, 及び k)は初代培養 MSC(b, d, f, h, j 及び l)と同等の多分化能をもっている。a と b, 骨分化誘導後の alizarin red 染色; c と d, 軟骨分化誘導後の alcian blue 染色; e と f, 脂肪分化誘導後の oil-red O 染色; g と h, 神経分化誘導後の Tuj1 染色; i と j, 血管内皮分化誘導後の管腔形成; k と l, 筋分化誘導後の myosin heavy chain 染色。C2C12 との共培養でヒトの核を特異抗体によりオレンジで染色している。

Fig. 1 Multi-directional differentiation potential of osteosarcoma cells
Multi-directional differentiation potential was observed in an osteosarcoma cell line ANOS(a, c, e, g, i and k) as well as primary cultured MSC(b, d, f, h, j, and l). a and b, alizarin red staining after osteogenic induction; c and d, alcian blue staining after chondrogenic induction; oil-red-O staining after adipogenic induction; Tuj1 staining after neurogenic induction; Tube formation after vasculo-endothelial induction; Myosin heavy chain staining after myogenic induction. Cells were co-cultured with C2C12 and human nuclei was stained with a specific antibody exhibiting orange color.

These findings indicated that MSC which have been analyzed as a whole are a group of heterogeneous cells which has different potential of growth and differentiation, and provide a key to understand the basic biology of MSC.

2. Establishment of surveillance system for transformation of MSC

Cancer cells are now considered to be derived from tissue stem cells resided in each tissue, and therefore MSCs are potentially progenitors of malignant tumors developed in the mesenchymal tissues, sarcomas. Several reports showed that the chromosomal aberrations may take place during the culture of mouse and also human MSC, especially when cells were seeded and cultured in low density condition to stimulate growth. This issue should be seriously considered to promote the regenerative medicine in mesenchymal tissues using MSC. As one of important initial mutations, we have focused on the methylation of the p16 gene, and established the method to detect the methylation quantitatively. Using this method, we have found that the methylation of the p16 gene did take place during the in vitro culture of MSC elongating the in vitro life. With additional analyses of other type of mutations, our final goal is to establish the transformation surveillance system of MSC.

From the oncological standpoint of view, this issue may relate to the presence of cancer stem cell in sarcoma tissues which has a differentiation potential as MSC. Actually we have found that several sarcoma cell lines have a multi-directional differentiation potential as MSC or neural crest stem cells (Fig. 1). Based on these findings we have investigated the potential application of differentiation induction therapy for sarcoma cells.

3. Development of the new treatment for difficult pathological conditions using MSC

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. As the basic experiments, we have established dog models of avascular necrosis of lunate bone (Kienbeck disease), and treated them with MSC in combination with artificial bone materials. The MSC transplantation regenerated the lunate bone with strong enough to show no collapse. Based on these results, we submitted the clinical trial protocol for the approval to the ethical committee of Kyoto University and also to the Ministry of Health, Labour and Welfare.

4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the in situ treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostaglandin E2, which is one of physiological active materials, and investigated the application of PGE2 to the regeneration therapy of articular cartilage. We have reported that the EP2-specific agonist can stimulate the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Subsequently we have performed the in vivo experiments using rabbits, and found that in combination with appropriate DDS, EP2 agonist can stimulate the cartilage regeneration in vivo, which is another promising regeneration therapy close to the clinical application.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Shima, Y., Okamoto, T., Aoyama, T., Yasura, K., Ishibe, T., Nishijo, K., Shibata, K.R., Kohno, Y., Fukiage, K., Otsuka, S., Uejima, D., Nakayama, T., Nakamura, T., Kiyono, T., Toguchida, J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras^{Val12}. *Biochem Biophys Res Commun.* 353 : 60-6, 2007.

- Kohno, Y., Okamoto, T., Ishibe, T., Nagayama, S., Shima, Y., Nishijo, K., Shibata, K.R., Fukiage, K., Otsuka, S., Uejima, D., Araki, N., Naka, N., Nakashima, Y., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Expression of Claudin7 Is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas and regulated by an Ets family transcription factor, ELF3. *J Biol Chem.* 281 : 38941-50, 2006.
- Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Aoyama, T., Shibata, K. R., Otsuka, S., Fukiage, K., Nishijo, N., Ishibe, T., Shima, T., Otsuki, B., Azuma, T., Tsutsumi, S., Nakayama, T., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Regeneration of osteonecrosis of canine scapho-lunate using bone marrow stromal cells : possible therapeutic approach for Kienböck disease. *Cell Transplantation*, 15 : 411-22, 2006.
- Otsuka, S., Nishijo, K., Nakayama, T., Aoyama, T., Ishibe, T., Shibata, KR, Shima, Y., Nakamura, T., Otsuka, T., Toguchida, J. A variant of the *SYT-SSX2* fusion gene in a case of synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 167 : 82-8, 2006.
- Matsusaki, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Okamoto, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Expression of the cadherin-11 gene is a discriminative factor between articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 14 : 353-66, 2006.
- 戸口田淳也：骨系統疾患のゲノム学. *ゲノム医学*, 6 : 67-74, 2006.
- 戸口田淳也, 大塚聖視：軟部肉腫の細胞起源. *細胞*, 38 : 402-405, 2006.
- 青山朋樹, 戸口田淳也. 大腿骨頭壊死の最新治療と再生医学応用の可能性. *治療*. 88 : 2795-9, 2006.

2) 著 書

- 青山朋樹, 中村孝志. 関節リウマチ. 関節リウマチの診断と薬物療法. *臨床病態学3 ノーベルヒロカワ* pp39-43, 2006.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 青山朋樹, 松崎尚志, 岡本 健, 西庄功一, 石部達也, 柴田弘太郎, 嶋 靖子, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也：Cadherin-11 遺伝子の発現は関節軟骨と成長軟骨の違いを規定する因子である. 第 19 回日本軟骨代謝学会 (2006.3.4. 横浜)
- 嶋 靖子, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 石部達也, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也：間葉系幹細胞初代培養系における癌化関連変異の解析. 第 19 回日本軟骨代謝学会 (2006.3.4. 横浜)
- 石部達也, 中山富貴, 長山聡, 中村孝志, 戸口田淳也：滑膜肉腫に対する分子標的治療の可能性. 第 106 回中部日本整形外科災害外科学会 (2006.4.7. 大阪)
- 保坂泰介, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也, 坪山直生：ユーイング肉腫の治療成績. 第 12 回小児固形腫瘍研究会 (2006.4.14. 京都)
- 大塚聖視, 青山朋樹, 戸口田淳也：幹細胞研究からみた骨肉腫の多分化能. 第 26 回近畿肉腫研究会 (2006.5.27. 大阪)
- 青山朋樹：間葉系幹細胞の癌化機構とそのモニタリングシステムについての提案. 第 1 回組織工学ワーキンググループ検討会 (2006.5.29. 京都)

Ishibe, T., Otsuka, S., Aoyama, T., Toguchida, J. : Gene-expression pattern and differentiation potential of synovial sarcoma suggests its cell-of-origin as neural crest-derived cells.

The Joint Symposium of the IVR 50th Anniversary Symposium and the 2nd International Symposium of Institutes Network (2006.5.30. 京都)

中山富貴, 坪山直生, 保坂泰介, 戸口田淳也, 中村孝志 : デスモイドの自然経過. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

嶋 靖子, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 石部達也, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞初代培養系における癌化関連遺伝子の変異解析. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

渡部基信, 足立壮一, 今井 剛, 水嶋康浩, 松原 央, 平海良美, 細井 創, 杉本 徹, 戸口田淳也, 中畑龍俊 : ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は malignant rhabdoid tumor に対して, AIF を介し autophagic cell death を誘導する. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

上島大輔, 西庄功一, 石部達也, 青山朋樹, 影山 進, 岩城秀出洙, 中村孝志, 飯田寛和, 吉貴達寛, 戸口田淳也 : 新規癌関連遺伝子 C7orf24 の骨肉腫における発現および機能解析. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

中山富貴, 保坂泰介, 戸口田淳也, 坪山直生, 中村孝志 : 軟部悪性腫瘍の治療成績. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

保坂泰介, 中山富貴, 坪山直生, 中村孝志, 戸口田淳也 : 5 年以上無病期間を維持した後に再燃した骨肉腫の 3 例. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞様の多分化能をもつ骨肉腫培養細胞系の樹立. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6. 札幌)

吹上謙一, 青山朋樹, 岡本 健, 柴田弘太郎, 大塚聖視, 布留守敏, 中村孝志, 戸口田淳也 : 不死化間葉系幹細胞を用いた間葉系幹細胞の分化方向関連表面マーカーへのアプローチ. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.8. 京都)

青山朋樹, 柴田弘太郎, 嶋 靖子, 大塚聖視, 吹上謙一, 布留守敏, 大塚隆信, 前川平, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞の細胞治療に向けた品質管理機構の構築. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.8. 京都)

保坂泰介, 中山富貴, 中村孝志, 坪山直生, 戸口田淳也 : 大腿骨遠位部骨腫瘍に対する K-MAX KNEE system の使用経験. 第 107 回中部日本整形外科災害外科学会 (2006.10.7. 神戸)

Shima, Y., Okamoto, T., Aoyama, T., Ishibe, T., Nishijo, K., Shibata, K.R., Nakayama, T., Nakamura, T., Kiyono, T., Toguchida, J. : Transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12 associates with the induction of autophagy and the loss of osteogenic property. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2. Venice)

Kohno, Y., Ishibe, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. : Expression of claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas, and regulated by a member of ets family transcription factor, ELF3. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2. Venice)

Shibata, K.R., Aoyama, T., Shima, Y., Kohno, Y., Ohtsuka, S., Nakamura, T., Toguchida, J. : Expression of p16INK4 in mesenchymal stem cells and the effect on growth. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2. Venice)

光野芳樹, 石部達也, 長山 聡, 西庄功一, 青山朋樹, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也 : 滑膜肉腫における上皮構造形成に関するクローニン遺伝子群の解析. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006.11.8. 名古屋)

大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞様の分化特性をもつ骨肉腫培養細胞系の樹立. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006.11.8. 名古屋)

光野芳樹, 石部達也, 長山聡, 青山朋樹, 中村孝志, 戸口田淳也: 滑膜肉腫における上皮構造形成に関するクロロ
ディン遺伝子群の解析. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会(2006.11.19. 長崎)

嶋靖子, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 間葉系幹細胞初代培養における癌化関連遺伝
子の変異解析. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会(2006.11.19. 長崎)

青山朋樹, 柴田弘太郎, 嶋靖子, 大塚聖視, 吹上謙一, 布留守敏, 中村孝志, 戸口田淳也: 間葉系幹細胞移植治療
に向けた品質管理機構の構築. 第28回日本バイオマテリアル学会(2006.11.27. 東京)

大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 吹上謙一, 池口良輔, 柿木良介, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: 無腐性骨
壊死病態に対する生体材料と間葉系幹細胞を用いた治療法の開発. 第28回日本バイオマテリアル学会
(2006.11.28. 東京)

2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也: 骨軟部腫瘍の遺伝子診断の現状と課題. 第25回兵庫県阪整会(2006.2.16. 尼崎)

戸口田淳也: 骨軟部肉腫の遺伝子解析と診断応用の現状. 第4回肉腫研究会(2006.3.24. 京都)

戸口田淳也: 間葉系幹細胞を用いた骨壊死の治療. 第12回組織工学・再生医学ワークショップ(2006.4.22. 京都)

戸口田淳也: 難治性骨折に対する細胞治療の可能性について. 第3回骨折シンポジウム(2006.9.8. 大津)

戸口田淳也: 軟部腫瘍の治療. 第14回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍特別研修会(2006.11.20. 長崎)

戸口田淳也: 再生医療の現状と課題. 第3回バイオ産業創成研究会(2006.12.7. 京都)

器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

助教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

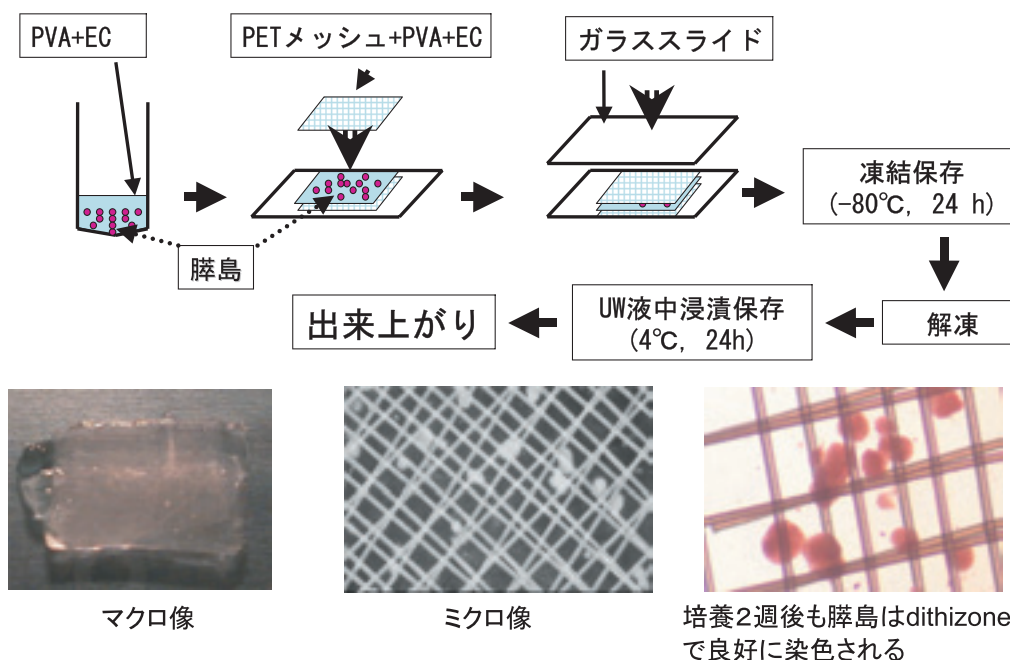
【研究概要】

本分野では、膵 Langerhans 島(膵島)の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。重症糖尿病治療は主としてインスリン補充療法に依存してきたが、根本的治療をめざす膵臓や膵島の移植が我が国でも少しずつ増加してきている。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、ここ数年、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植も、実施施設間の成績のばらつきや、長期的な有効性に疑問が持たれるなど、なお解決されるべき問題が多い。

膵島再生医療を実現するための道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいは胎生幹(ES)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されており、これらの方法が一部でも応用可能となれば、ドナー不足の

PVA凍結・再解凍による新しいバイオ人工膵

凍結液：Euro-Collins液，10 mM Nicotinamide，10% FBS，5% DMSO + 3% PVA



問題は相当程度解決される。しかし、患者自身に由来する細胞を使用するのでない限り拒絶反応の対象となり、また、治療対象疾患が自己免疫の関与する1型(インスリン依存性)糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、膵島や膵島様細胞を免疫隔離能を有する各種の半透膜で包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待されるバイオ人工膵の研究を行っている。このようなバイオ人工膵が臨床に応用できるようになれば、重症糖尿病に対する有力な治療法となり得る。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いて、メッシュ補強ポリビニルアルコール(PVA)バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるマクロカプセル化など、各種のバイオ人工膵の研究開発を行ってきた。また、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織を移植部位とすることで、このようなデバイスの皮下移植によって異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルを用いて明らかにしてきた。さらに最近では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした全く新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓くものと考えている。本年は、このバイオ人工膵を用いてラットから重症糖尿病ラットへの同種異系膵島移植実験を行っており、単純な膵島移植では拒絶されるウイスター系からLewis系への移植であっても、比較的長期の血糖低下が得られることを確認している。

また、バイオ人工膵の皮下移植や、閉塞性動脈硬化症など虚血性疾患の治療に応用する目的で、血管新生誘導の基礎的研究を行っており、本年は、ラット背部の虚血皮弁モデルを用いて、フィブリンや抗狭心症薬であるニコランジルが、虚血性皮弁の血流を改善し、壊死を抑制することを報告した。

その他の関連事項としては、マウス ES 細胞から膵島様細胞塊が誘導できることをすでに報告しているが、さらにドパミン産生神経細胞の誘導に成功し、これを用いた移植実験における有効性を京都薬科大学との共同実験で確認し、報告した。また、通常は *in vitro* では増殖しない膵島細胞が未分化細胞との細胞融合によるリプログラミングを通して増殖能を獲得する可能性について検討する目的で、電気的細胞融合の実験を行い、基礎的な細胞融合技術をほぼ確立した。さらに、糖尿病の病態研究や、モデル予測による機械的人工膵臓の制御を視野にいて、全身糖代謝シミュレータの構築を目指した研究も、京都大学工学研究科との共同で進行中であり、本年は、人工膵を装着した麻酔下犬を用いて収集したデータをもとに比較的初歩的ながらオリジナルのモデルを構築し、発表した。

The major object of our laboratory is development of regenerative medicine for diabetes mellitus. The patient number of diabetes mellitus is significantly growing all over the world. The goal of our studies is to establish a safe and effective therapy available for every diabetes patient whenever required. Therapy for severe diabetes mellitus still depends mostly on insulin injection. In Japan, a slightly increasing number of patients are recently treated by pancreas organ transplantation and islet transplantation. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, islet transplantation that drew attention as a promising curable treatment has become less attractive because of rather a short duration of insulin-free period after transplantation and poor outcome in some facilities. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dreams.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic or embryonic stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. If these cells are clinically usable, the problem of donor shortage will be solved. However, as long as allo-geneic cells are used and considering that, even in the situation of auto-transplantation, type-1 diabetes is an autoimmune disease, efficient immunosuppression should still be required. In order to avoid immunosuppression, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane and protected from host immune responses.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bioartificial pancreas such as mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make sheet type macro-devices of PVA gel by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel-like solid after freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enable us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans. Using this macro-device, we recently found that implantation of a bioartificial pancreas to a diabetic rat can improve hyperglycemia for considerably long duration even in the allo-geneic situation in that transplanted free islets are promptly rejected (Wistar to Lewis).

Other related researches are as follows. We studied fibrin solution and nicorandil, a drug for angina pectoris, to

treat ischemic skin flaps and local application of fibrin and oral administration of nicorandil can successfully reduce the ischemic necrosis with an increase in tissue blood flow. We have made dopaminergic neuron-like cells from mouse ES cells and showed effects of these cells when transplanted into the brain of Parkinsonism model rat. In addition, we are studying to establish a simulator of systemic glucose metabolism for a possible use to control mechanical artificial pancreas and, from the data obtained from dog experiment using artificial pancreas, constructed an original prototype of the simulator.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Shirouzu Y, Gu Y, Koga M, Sakurai T, Qi M, Hiura A, Sumi S, Inoue K. Cold preservation of islets in UW solution -with special reference to apoptosis. J Surg Res **133** : 167-175 (2006)
- Sakata N, Gu Y, Qi M, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Sunamura M, Matsuno S, Inoue K. Effect of rat-to-mouse bio-artificial pancreas xenotransplantation on diabetic renal damage and survival. Pancreas **32** : 249-57 (2006)
- Qi Z, Gu Y, Kim D, Hiura A, Sumi S, Inoue K. The effect of fibrin on the survival of ischemic skin flap in rats. Plastic and Reconstructive Surgery (in press)
- Qi Z, Hiura A, Nakagawa N, Koga M, Yanai G, Sumi S, Inoue K. Oral administration of nicorandil enhances the survival of ischemic skin flap in rats. Eur J Pharmacol **550** : 127-133 (2006)
- Yanagisawa D, Qi M, Kim DH, Kitamura Y, Inden M, Tsuchiya D, Takata K, Taniguchi T, Yoshimoto K, Shimohama S, Akaike A, Sumi S, Inoue K. Improvement of focal ischemia-induced rat dopaminergic dysfunction by striatal transplantation of mouse embryonic stem cells. Neurosci Lett. **407** : 74-79. (2006)

2) 著書・総説

- 角 昭一郎 特集：小児に対する移植医療の進歩〈日本の小児移植医療の現状と課題〉 臓器移植—糖尿病に対する移植医療 小児内科 38 : 2055-2061, (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 角 昭一郎, 漆 智, 柳井伍一, 古賀まり, 日裏彰人, 井上一知 マクロカプセル化バイオ人工臓の現状と展望 第33回臓・臓器移植研究会(2006.3.17-19. 千葉市)
- 角 昭一郎, 漆 智, 柳井伍一, 井守直美, 古賀まり, 佐竹 晃, 日裏彰人, 井上一知 臓切除と臓管結紮の比較によるラット臓再生機序の検討 第106回日本外科学会定期学術集会(2006.3.29-31. 東京都)
- 新藤雅人, 古谷栄光, 佐竹 晃, 角 昭一郎, 井上一知 門脈コンパートメントを含む血糖調節機構モデルのパラメータの検討 第50回システム制御情報学会研究発表講演会(2006.5.10-12. 京都市)
- 新藤雅人, 古谷栄光, 佐竹 晃, 角 昭一郎, 荒木光彦 門脈血行動態を考慮して血糖値調節機構モデルパラメータ 第1回複合医工学シンポジウム(2006.5.19-20. 京都市)

角 昭一郎, 漆 智, 柳井伍一, Shakibur Rahman, 日裏彰人, バイオ人工臓の開発 IFMS, IMEG, CDB ジョイントフォーラム(2006.10.10-11. 京都市)

漆 智, 柳井伍一, 日裏彰人, 角 昭一郎, 井上一知 凍結法による polyvinyl alcohol (PVA) バイオ人工臓に関する検討 第33回日本臓器保存生物医学会総会(2006.11.23-24. 東京都)

2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎 糖尿病に対する再生医療の現況 医工学フォーラム 2005(2006.2.22. 京都市)

角 昭一郎 幹細胞と臓器の再生医療 日本再生歯科医学会シンポジウム(2006.2.26. 京都)

角 昭一郎 糖尿病に対する再生医療的アプローチ 第5回日本再生医療学会総会 シンポジウム 3(2006.3.8-9. 岡山市)

臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

助教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

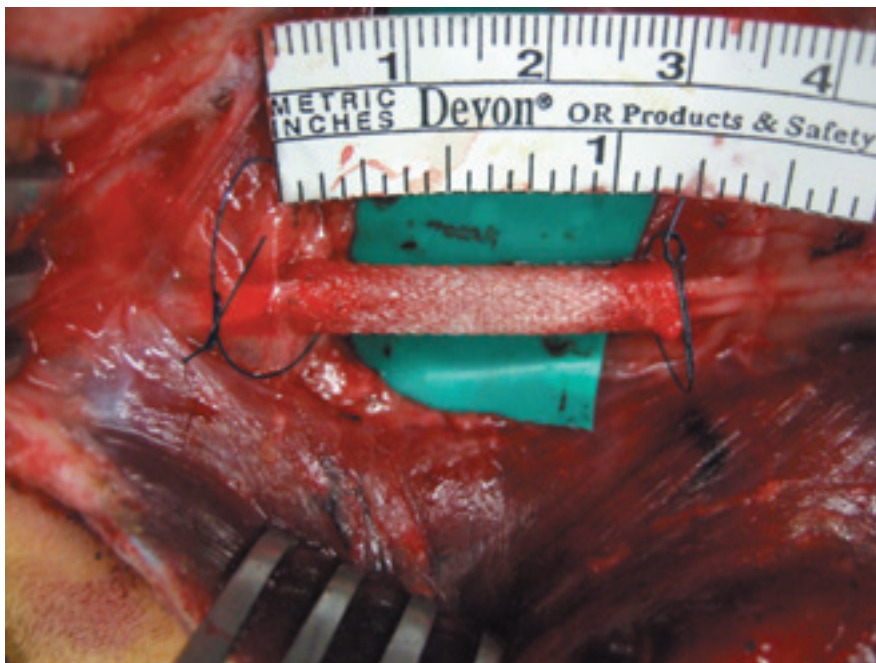
【研究概要】

臓器再建応用分野の研究目的は、新しい *in situ* Tissue Engineering や再生医学を推進して人間の幸福に貢献することです。これによって、これまで治療法がなかった患者、或いは移植ドナーの不足のために治療が受けられない症例が救われることを目指します。さらに、再生医療が普及することにより高騰を続ける医療費が抑制され、これによって社会に貢献すると考えています。

人間の体には秘められた再生能があります。それを引き出す新しい手法を開発しています。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる足場となる適切な環境を体内に与えることによって、自己の臓器が本来の構造と機能を取り戻して再生復元するようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である(1)足場、(2)細胞、(3)増殖・成長因子、を生体内で働かせる *in situ* Tissue Engineering という方法を独自に開発してそれを進めています。すなわち、同種・異種の臓器や組織から酵素で分解・抽出して完全に免疫原性をなくしたコラーゲンから再構成した細胞外マトリックス、或いは Detergent で細胞を完全に除去した細胞外マトリックス、生体内で分解吸収される合成高分子、増殖因子など DDS(薬物送達システム)を組み合わせ、欠落した組織や臓器の再生する足場となる枠組み(細胞外マトリックス)を生体内に作ります。この枠組みを足場として利用して、生体内の幹細胞が増殖、分化し、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、幹細胞の分離・増殖を行い組織再生に用いる研究や瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして、再び本来の細胞外マトリックスに戻す研究も進めています。

現在行っている研究内容は下記のように分類されます。

- ①角膜、心膜、胸膜、腹膜、脳硬膜などの膜系
- ②血管、気管、喉頭、消化管などの管状臓器



新しい人工神経(末梢神経誘導管)の開発

臓器再建応用分野で開発された人工神経は2002年より臨床使用が開始され現在までにすでに300本以上が神経欠損症例に使われている。これは *in situ* Tissue Engineering に基づく再生医学の臨床応用であり、当研究分野ではさらに長い欠損を短期間に修復可能な人工神経に取り組んでいる。この写真の人工神経は目下開発中の新型人工神経で、外筒の分解性高分子材料を従来の素材からさらに分解の遅いものに改良し性能の向上をはかっている。安全性と機能の評価を行い、臨床へ研究成果を還元できるように動物実験を続けている。

- ③外力の加わる組織(骨、永久歯、歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・大脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺臓、肝臓、甲状腺、上皮小体、脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織や皮膚、その他軟組織
- ⑨この他に人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩バイオマテリアルの研究

当分野の研究は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を還元させる“場”(環境)を人工的に体の中に作れば、哺乳動物の臓器や組織もいもりのように再生還元するというメカニズムを医学に応用するものです。このような *in situ* Tissue Engineering は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法で人工気管や人工神経など臨床に応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になると考えています。

In situ Tissue Engineering : We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Or-

gans made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

Cell+ECM Method

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- 中村達雄：末梢神経の再生. 治療. **88**: 3028-3032 (2006)
- 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 森本 茂：神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に
対する生体内再生治療. 末梢神経. **17**: 325-327 (2006)
- 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 佐藤 聡, 金丸真一, 安里 亮, 山下 勝：気
道の再生と臨床応用. 分子呼吸器病. **10**: 72-75 (2006)
- 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸真一, 安里 亮, 山下 勝：甲状腺癌治療における気
道の再生医療. 再生医療. **5**: 89-93 (2006)
- 大森孝一, 多田靖宏, 松塚 崇, 野本幸男, 鈴木輝久, 中村達雄, 金丸真一, 安里 亮, 山下 勝, 田中信三：喉
頭・気管狭窄の再生治療. 日本気管食道科学会会報. **57**: 153-154 (2006)
- Kishimoto, M., Kanemaru, S., Yamashita, M., Nakamura, T., Tamura, Y., Tamaki, H., Omori, K., Ito, J.: Cranial bone
regeneration using a composite scaffold of beta-tricalcium phosphate, collagen, and autologous bone fragments.
Laryngoscope. **116**: 212-216 (2006)
- Kobayashi, K., Nomoto, Y., Suzuki, T., Tada, Y., Miyake, M., Hazama, A., Kanemaru, S., Nakamura, T., Omori, K.: Ef-
fect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. Tissue Eng. **12**: 2619-28 (2006)
- Tao, H., Araki, M., Sato, T., Morino, S., Kawanami, R., Yoshitani, M., Nakamura, T.: Bronchoscopic treatment of
postpneumectomy bronchopleural fistula with a collagen screw plug. J Thorac Cardiovasc Surg. **132**: 99-104
(2006)
- Tanaka, S., Takigawa, T., Ichihara, S., Nakamura, T.: Mechanical properties of the bioabsorbable polyglycolic acid-
collagen nerve guide tube. Polym. Eng. Sci. **46**: 1461-1467 (2006)
- Nakashima, S., Nakamura, T., Miyagawa, K., Yoshikawa, T., Kin, S., Kuriu, Y., Nakase, Y., Sakakura, C., Otsuji, E.,
Hagiwara, A., Yamagishi, H.: In situ tissue engineering of the bile duct using polypropylene mesh-collagen
tubes. Int J Artif Organs. (in press)
- Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Kin, S., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Fukuda, K., Kuriu, Y., Miyagawa, K.,
Sakakura, C., Otsuji, E., Shimizu, Y., Ikada, Y., Yamagishi, H.: Tissue engineering of small intestinal tissue us-
ing collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. Tissue Eng. **12**: 403-412 (2006)
- Nakase, Y., Nakamura, T., Kin, S., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Kuriu, Y., Miyagawa, K., Sakakura, C., Otsuji, E.,
Ikada, Y., Yamagishi, H., Hagiwara, A.: Endocrine cell and nerve regeneration in autologous *in situ* tissue-
engineered small intestine. J Surg Res. (in press)
- Nomoto, Y., Suzuki, T., Tada, Y., Kobayashi, K., Miyake, M., Hazama, A., Wada, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Omori,
K.: Tissue Engineering for regeneration of the tracheal epithelium. Ann Otol Rhinol Laryngol. **115**: 501-6
(2006)
- 萩原明於, 阪倉長平, 大辻英吾, 山岸久一, 中村達雄, 清水慶彦：癌治療における神経再生の応用. 再生医療. **5**:
99-103 (2006)
- Matsuno, T., Nakamura, T., Kuremoto, K., Notazawa, S., Nakahara, T., Hashimoto, Y., Satoh, T., Shimizu, Y.: Develop-

ment of β -tricalcium phosphate/ collagen sponge composite for bone regeneration. Dental Materials Journal. **25** : 138-144 (2006)

Morino, S., Toba, T., Araki, M., Azuma, T., Tsutsumi, S., Tao, H., Nakamura, T., Nagayasu, T., Tagawa, T. : Noninvasive assessment of pulmonary emphysema using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Exp Lung Res. **32** : 55-67 (2006)

Yamashita, M., Omori, K., Kanemaru, S., Magrúfov, A., Tamura, Y., Umeda, H., Kishimoto, M., Nakamura, T., Ito, J. : Experimental regeneration of canine larynx : a trial with tissue engineering techniques. Acta Otolaryngol. (in press)

Yamashita, M., Kanemaru, S., Hirano, S., Magrúfov, A., Tamaki, H., Tamura, Y., Kishimoto, M., Omori, K., Nakamura, T., Ito, J. : Tracheal regeneration after partial resection : A tissue engineering approach. Laryngoscope. (in press)

2) 著 書

森野茂行, 永安 武, 中村達雄 : 肺気腫.「細胞増殖因子と再生医療」(編: 松本邦夫, 田畑泰彦, メディカルレビュー社) 101-105 (2006)

3) 総 説

稲田有史, 中村達雄, 森本 茂, 飯田秀之, 古家 仁, 細井裕司 : 末梢神経損傷に対する Polyglycolic acid (PGA)-Collagen tube を用いた生体内再生治療 末梢神経損傷か複合性局所疼痛症候群へ.大阪臨床整形外科医会会報. **32** : 76-81 (2006)

稲田有史, 中村達雄 : 神経因性疼痛治療の未来 : 神経因性疼痛に対する神経再生治療の実際. LiSA. **13** : 978-981 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

中村達雄, 佐藤寿彦, 市原理司, 小林丈士, 中田 顕, 荒木政人, 田尾裕之, 上田寛樹, 遠藤克昭, 東 高志, 稲田有史, 早川克己 : 組織再生型人工気管の 6 年間長期観察. 第 27 回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)

Asato, R., Kanemaru, S., Yamashita, M., Omori, K., Nakamura, T., Ito, J. : Skull base regeneration by polypropylene mesh coated with collagen+beta-TCP. 109th The Triological Society (2006.5.19-22. Chicago)

Araki, M., Tao, H., Sato, T., Nakajima, N., Sugai, H., Nagayasu, T., Nakamura, T. : Experimental study on in situ tissue engineering of stomach using new collagen sponge scaffold coated with biodegradable copolymers. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10. Chicago)

荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 永安 武, 中村達雄 : コラーゲンスポンジと吸収性ポリマーを用いた in situ tissue engineering による胃壁再生への取り組み. 第 27 回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)

荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 玄 丞然, 永安 武, 中村達雄 : 新しい生体内分解性合

- 成接着剤を用いた肺癰閉鎖の研究, 第 59 回日本胸部外科学会定期学術集会(2006.10.1-4. 東京)
- 荒木政人: 新しい痔瘻治療材料の開発, 第 77 回近畿肛門疾患懇談会(2006.11.11. 大阪)
- 稲田有史: 生体内再生治療を用いた末梢神経・軟部組織損傷の現状, 第 9 回岡山外科バイオ・レスポンス研究会(2006.1.13. 岡山)
- 稲田有史: 生体内再生治療を用いた末梢神経・軟部組織損傷の治療, 第 2 回岡山再建医学研究会(2006.2.11. 岡山)
- 稲田有史: Complex Regional Pain Syndrome への挑戦, 高知疼痛研究会(2006.2.17. 高知)
- 稲田有史: 神経因性疼痛に対する生体内再生治療の実践, 第 35 回日本慢性疼痛学会(2006.2.24. 東京)
- 稲田有史: 神経因性疼痛に対する生体内再生治療の現状, 第 4 回整形外科痛みを語る会(2006.7.1. 札幌)
- 稲田有史: 四肢軟部組織, 末梢神経損傷に対する生体内再生治療, 第 3 回群馬創傷治療フォーラム(2006.7.7. 群馬)
- 稲田有史: 神経因性疼痛ならびに CRPS(Complex regional pain syndrome)に対する生体内再生治療, 日本ペインクリニック学会第 40 回大会(2006.7.15. 神戸)
- 稲田有史: 神経因性疼痛ならびに CRPS(Complex regional pain syndrome)に対する生体内再生治療, 第 17 回日本末梢神経学会学術集会(2006.8.19. 守口)
- 稲田有史: 難治性疼痛への再生医療の応用, 学術フロンティア推進事業キックオフシンポジウム(2006.8.25. 広島)
- 稲田有史: 神経因性疼痛に対する生体内再生治療の現状, 第 5 回神奈川痛みの研究会(2006.9.2. 横浜)
- Inada, Y., Nakamura, T., Toba, Y., Morimoto, S., Yamashita, S., Takakura, Y., Inada, M.: In-situ tissue engineering for the treatment of peripheral nerve injuries with a Polyglycolic acid-Collagen tube in Japan. 44th Annual Meeting of the Italian Society for Surgery of the Hand (2006.10.13. Milano)
- 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 高倉義典: 末梢神経生体内再生治療: 臨床応用の現状, 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会(2006.10.19. 長崎)
- 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 川西弘一, 橋爪圭司, 古家 仁, 小島康宣, 重松浩司, 河村健二, 矢島弘詞, 高倉義典, 面川庄平: 神経因性疼痛ならびに CRPS(Complex regional pain syndrome)に対する生体内再生治療の成績, 第 33 回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2006.10.27. 奈良)
- 稲田有史, 川西弘一, 面川庄平: 指尖損傷に対する遊離穿通皮弁移植術, 第 33 回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2006.10.27. 奈良)
- 稲田有史, 中村達雄, 遠藤克昭, 諸井慶七郎, 中山佳奈, 橋爪圭司, 古家 仁: 難治性疼痛に対する生体内再生医療最前線: 21 世紀のミステリーへの挑戦, 第 44 回日本人工臓器学会大会(2006.11.1. 横浜)
- 稲田有史: 生体内再生治療による末梢神経ならびに軟部組織再建の現状, 第 26 回兵庫県形成外科医会研究会/第 3 回近畿形成外科医会連合学術講演会(2006.11.11. 神戸)
- 市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 遠藤克昭, 藤川孝満, 福田正順, 糸井真一, 中田 顕, 種谷 出, 瀧川敏算, 黒澤 尚: 距離のある神経欠損に対する神経チューブの開発, 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 上田寛樹, 福田正順, 山本雅哉, 中村達雄, 田畑泰彦: 熱脱水架橋コラーゲンスポンジとトランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ との相互作用, 第 9 回日本組織工学会(2006.9.8. 京都)
- Umeda, H., Kanemaru, S., Yamashita, M., Kishimoto, M., Tamura, Y., Nakamura, T., Asato, R., Omori, K., Ito, J.: Tissue Engineered bone regeneration of canine skull using bone marrow derived stromal cells and β -TCP. 109th annual meeting of Triological Society (2006.5.19-22. Chicagao)
- 梅田裕生, 金丸真一, 岸本正直, 山下 勝, 田村芳寛, 中村達雄, 大森孝一, 伊藤壽一: β -TCP を利用した組織工

- 学的犬頭蓋骨再生. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 梅田裕生, 金丸眞一, 岸本正直, 山下 勝, 田村芳寛, 中村達雄, 大森孝一, 伊藤壽一: β -TCP と自己骨髄由来間葉系細胞を利用した組織工学的犬頭蓋骨再生. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- Omori, K., Tada, Y., Suzuki, T., Nomoto, Y., Nakamura, T., Kanemaru, S., Yamashita, M., Asato, R.: Clinical application of in situ tissue engineering for the laryngeal and tracheal tissue. 127th American Laryngological Association (2006.5. 19-20. Chicago)
- 岡本英之, 細井裕司, 稲田有史, 金丸眞一, 中村達雄: 人工神経(PGA-collagen tube)を用いて顔面神経再建術を施行した耳前部悪性腫瘍の 1 例. 第 29 回日本顔面神経研究会(2006.6.1-2. 新潟)
- Kanemaru, S., Yamashita, M., Magrúfov, A., Umeda, H., Tamura, T., Omori, K., Nakamura, T., Ito, J.: Tissue engineered regeneration of recurrent laryngeal nerve by two types of artificial nerve conduits. 127th American Laryngological Association (2006.5.19-20. Chicago)
- 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 大野恒久, 大森孝一, 平野 滋, 中村達雄, 伊藤壽一: 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 金丸眞一, 中村達雄, 山下 勝, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大野恒久, 大森孝一, 伊藤壽一: 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)
- 田尾裕之, 中村達雄: プレオマイシン肺線維症モデルラットに対する, 自己骨髄培養細胞経気道投与の効果. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 中井隆介, 東 高志, 福田正順, 中村達雄, 浦山慎一, 岸上義弘, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Diffusion Tensor MRI を用いたイヌの脊髄損傷モデルにおける脊髄修復過程の画像化. 第 34 回日本磁気共鳴医学学会大会(2006.9.14-6. つくば)
- Nakashima, S., Nakamura, T., Yoshikawa, T., Kin, S., Kuriu, Y., Nakase, Y., Sakakura, C., Otsuji, E., Hagiwara, A., Yamagishi, H.: Tissue engineering of the common bile duct using mesh-collagen hybrid scaffolds. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10. Chicago)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジを用いた新しい人工胆管作成の試み. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 栗生宜明, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジ及びポリ乳酸メッシュを用いた人工胆管作成の試み. 第 61 回日本消化器外科学会定期学術総会(2006.7.13-15. 横浜)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第 65 回日本癌学会学術総会(2006.9.28-30. 横浜)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第 44 回日本癌治療学会総会学術集会(2006.10.18-20. 東京)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Polypropylene Mesh-Collagen Tube による総胆管再生の試み. 第 68 回日本臨床外科学会(2006.11.9-11. 広島)
- Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Nakashima, S., Ikada, Y., Yamagishi, H.: Morphologic evaluation of autologous in situ tissue-engineered small intestine. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10. Chicago)

Nomoto, Y., Kobayashi, K., Suzuki, T., Tada, Y., Miyake, M., Omori, K., Hazama, A., Nakamura, T.: The effects of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. 86th The American Broncho-Esophagological Association (2006.5.19-20. Chicago)

野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 挟間章博, 中村達雄, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド型人工気管の作製. 第 107 回日本耳鼻咽喉科学会総会(2006.5.11-13. 東京)

野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 狭間章博, 和田郁夫, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド人工気管作製の試み. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)

野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 佐藤 聡, 岡野 渉, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 線維芽細胞を組み合わせたハイブリッド人工気管作製の試み. 第 9 回日本組織工学会(2006.9.7-8. 京都)

野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 和田郁夫, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: 気管由来線維芽細胞を含有したハイブリッド人工気管モデル. 第 58 回日本気管食道科学会(2006.10.5-6. 札幌)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 東 高志, 遠藤克昭, 早川克己, 市原理司, 西尾健資, 藤川孝満, 堤 定美: 脊髄損傷に対する有茎大網被覆治療の有効性. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)

Yamashita, M., Kanemaru, S.: Tracheal Regeneration after Partial Resection Using Tissue Engineering Technique- in vivo animal experiment. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International (2006.4.25-27. USA)

山下 勝, 金丸眞一, 梅田裕生, 田村芳寛, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: 気管部分切除モデルに対する組織工学的再生. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2006.7.11-12. 東京)

山下 勝, 金丸眞一, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: コラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュと大腿筋膜を用いたイヌ声門の再生. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

山下 勝: 声門の再生へむけて. 第 58 回日本気管食道科学会(2006.10.5-6. 札幌)

2) 講演・シンポジウム

中村達雄: 歯科医学分野における再生について. 日本再生歯科医学会シンポジウム(2006.2.26. 京都)

中村達雄: 再生医療とその臨床応用. 第 155 回歯科鑄造研究会(2006.2.25. 京都)

中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会(2006.10.12-13. 埼玉)

中村達雄: 末梢神経損傷と再生医学の臨床応用. 第 10 回京都内科神経懇話会(2006.9.2. 京都)

中村達雄: 末梢神経の再生 人工神経の基礎と臨床応用. 第 9 回 Sensory Rehabilitation セミナー(2006.9.23-24. 愛知)

中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第 3 回癌治療への再生医療応用研究会(2006.10.19. 東京)

鈴木輝久, 小林 謙, 多田靖宏, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: 気管上皮層の効果的再生. 第 58 回日本気管食道科学会(2006.10.5-6. 札幌)

多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 中村達雄, 安里 亮, 山下 勝, 大森孝一: 組織工学的手法を用いた気道再生の臨床応用. 第 58 回日本気管食道科学会(2006.10.5-6. 札幌)

附属再生実験動物施設

Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 坂口 志文

Acting Head, Prof. Shimon Sakaguchi

【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、2006年11月30日現在、イヌ；134頭、ネコ；7匹、サル；5頭、ウサギ；83羽、チンチラ；5匹、ラット；114匹、マウス；約15000匹が実験動物として飼育され、実験に供されている。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任助教授1名・技術職員2名・非常勤職員19名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF(Specific Pathogen Free)マウスの取り扱いについて講習を受けなければならない。動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験計画書審査委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002年12月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部附属ゲノム医学センターの3部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼働を開始してから3年が経過した。現在、SPFマウス飼育室・全16室中、再生研；11室、ウイルス研；4室、ゲノム医学センター；1室、を使用している。本マウス飼育棟ではSPFマウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能なSPFマウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受けSPF化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格な管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPFマウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPFマウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、この様な恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等である。また、イヌについても、飼育数と出入の厳密な把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能に

なった。しかしながら、施設・備品の老朽化が進行しつつあり、問題発生時に、まさに自転車操業的に対応しているのが現状である。また、毎年度予算的にも逼迫しており、このような対応がいつまで続けられるか予測不能である。今後は、南部棟動物施設と同様の受益者負担システムのさらなる導入と将来の大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる。

【研究概要】

再生実験動物施設は、再生医科学研究所の附属施設として、研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に関係する業務、動物実験に関する講習会の開催、再生研における実験動物の維持、管理など)と共に、一研究分野として以下の研究活動を行っている。

研究テーマ 1. GPI アンカー型蛋白質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは、膜結合蛋白質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型蛋白質の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である。このため、まず、個体内での GPI アンカー型蛋白質の局在を網羅的に解析するために、GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質 (EGFP-GPI) を構築した。これを導入したトランスジェニックマウスでは、予想以上に EGFP-GPI が、外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した (Kondoh G. et al. FEBS lett. 458, 299-303, 1999)。以後、この現象に特に着目し、マウス精巣生殖細胞より GPI アンカー型蛋白質遊離因子の精製・構造解析を行った。その結果、この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を単離した。すなわち、この酵素には、アンギオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず、多くの GPI アンカー型蛋白質を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとして、これらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI アンカー型蛋白質のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子-透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は in vivo で GPI アンカー型蛋白質遊離活性があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された (Kondoh G. et al. Nat. Med., 11, 160-166, 2005)。そこで、我々は、ACE の受精における機能をさらに追究するため変異型 ACE を導入したトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製した。その結果、作製した 2 種類の Tg マウスのいずれにおいても体外受精における受精率の低下がみられた。このことから、変異型 ACE-T は雄性生殖系においていわゆるドミナントネガティブ分子として機能していることが示唆された。また、1 系統では、変異型タンパク質が精巣において発現していたが、精子ではその発現が消失していたことから、同タンパク質は、精巣内で機能していると予想された (論文投稿中)。すなわち、ACE-T は、GPI アンカー型蛋白質遊離活性により精子上で機能すると同時に精巣内においてペプチダーゼとして機能し、二元的に受精に関与していることが示唆された。

研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作製技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作製には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作製の段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティン

グベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム(リコンビネーリング)を採用し、従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作製においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらぬ方法を可能にした(Kondoh G. et al. J. Biochem. Biophys. Methods., 39, 137-142, 1999)。これらの技術発展をもとに、現在までに幾多の遺伝子改変マウスの作製に参加している。

The angiotensin-converting enzyme (ACE) is a key regulator of blood pressure. It is known to cleave small peptides, such as angiotensin I and bradykinin and changes their biological activities. Additionally, we have previously described a novel activity for ACE: a GPI-anchored protein releasing activity (GPIase activity). This activity is not inactivated by substitutions of core amino acid residues for the dipeptidase activity, suggesting that the active site elements for GPIase differ from those for peptidase activity. Moreover, dipeptidase-inactivated mutant ACE and also PI-PLC rescued the egg binding deficiency of *Ace* knockout sperms, implying that ACE plays a crucial role in fertilization via this novel activity.

To investigate the contribution of ACE in fertilization further, we produced transgenic mouse lines carrying dipeptidase-inactivated mutants. Although the transgenic mice showed normal blood pressure, kidney morphology, and fertility, reduced fertilization was observed after *in vitro* fertilization (IVF). The sperm-zona pellucida (ZP) binding was exclusively impaired in these lines, in a manner similar to that observed in ACE knockout mouse. In a mutant transgenic line, a marked reduction in IVF efficiency was observed with testicular expression of transgenic protein but absent in the sperm, implying that dipeptidase-inactivated mutants affect germ cell development for ZP binding in a dominant-negative manner. Our results suggest that ACE contributes to fertilization as both GPIase (in the sperm) and dipeptidase (in the testis).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Rhee, J. M., Pirity, M. K., Lackan, C. S., Long, J. Z., Kondoh, G., Takeda, J. and Hadjantonakis, A-K. In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis*, 44, 202-218 (2006).
- Yae, K., Keng, V-W., Koike, M., Yusa, K., Kouno, M., Uno, Y., Kondoh, G., Gotow, T., Uchiyama, Y., Horie, K. and Takeda, J. Sleeping Beauty Transposon-Based Phenotypic Analysis of Mice: Lack of Arpc3 Results in Defective Trophoblast Outgrowth. *Mol. Cell Biol.*, 26, 6185-6196(2006).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 出口央士, 渡邊仁美, 吉田佳世, 森田 隆, 山田秀一, 近藤 玄: ペプチダーゼ欠損型アンギオテンシン変換酵素(ACE)の機能解析. 第53回日本実験動物学会(2006.5.11)神戸市

2) 講演・シンポジウム

近藤 玄：GPI アンカー型タンパク質遊離因子としてのアンギオテンシン変換酵素. Joint Forum -IFMS(京大再生研), IMEG(熊大発生研), CDB(理研)ー, 熊本大学(2006.1.30)熊本市

近藤 玄：GPI アンカー型タンパク質遊離酵素としての ACE. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「Membrane-proximal proteolysis: 膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端」, 大阪大学(2006.2.21)吹田市

Kondoh, G: Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. The Gordon Research Conference on Angiotensin. (2006.9.12, Aussois, France) (invited)

(文責；近藤 玄)

附属幹細胞医学研究センター Stem Cell Research Center

霊長類胚性幹細胞研究領域 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

分野主任 助教授 末盛 博文

Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

【研究概要】

ヒト ES 細胞株の樹立と特性解析

霊長類胚性幹細胞研究領域ではヒト及び他の霊長類 ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。我々が樹立したヒト ES 細胞株は 2004 年 3 月に分配を開始し、これまでに 20 件以上の研究計画に対して細胞株の分配を行った。

ヒト ES 細胞において 12 番、17 番染色体のトリソミーのような染色体異常が高頻度で認められるとの論文報告以来、この問題がヒト ES 細胞の医療応用において重大な問題を引き起こす可能性があるとして世界的に大きな関心を持たれ、ES 細胞の医療応用における安全確保上重要な課題と認識され詳細な分析が進められている。そのため我々も昨年度に引き続いて培養過程における染色体異常の出現に関する分析をすすめた。我々が確立した培養条件で継代を行った場合、1 年程度の長期培養においても染色体異常は認められず、さらに長期間の継代培養実験を行った場合も同様であった。上記のような染色体異常は不適切な継代維持により発生頻度が上昇するとの報告もあるが、我々が開発した継代維持法は、ヒト ES 細胞の安定的かつ長期間の培養を可能にするという点で他の方法と比較し優れた手法であると考えられる。

カニクイザル ES 細胞における Oct-3A, Oct-3B の機能

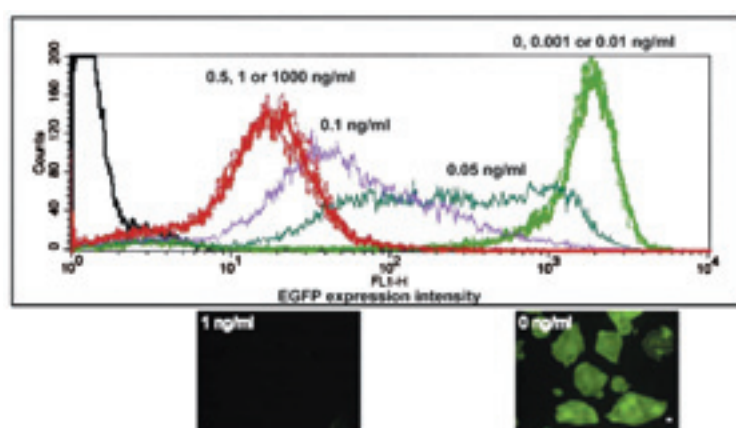
我々は ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究として、霊長類 ES 細胞の多能性維持機構、自己複製能に関する研究を行っている。ES 細胞の未分化性維持機構の研究はこれまで主にマウス ES 細胞を用いてなされてきたが、これまでに我々が示してきたようにマウスと霊長類ではさまざまな相違があることが分かってきている。そのため霊長類 ES 細胞を用いた未分化性維持機構の研究が重要である。

Oct-3 は、その発現量の厳密な制御がマウス胚性幹細胞(ES 細胞)の未分化性維持に重要な転写因子であり、ヒトでは Oct-3A、Oct-3B のスプライシングフォームが存在している。これらのうち Oct-3A がマウス Oct-3 のオースログとされるがこれらの機能は明らかでなかった。霊長類 ES 細胞における Oct-3 の機能を検討するためカニクイザル ES 細胞から Oct-3 をクローニングしたところ、ヒト同様に Oct-3A と Oct-3B のスプライシングフォームがえられた。これらの強制発現ベクターをカニ ES 細胞に導入し安定導入株を作製すると、コロニーは未分化状態を保持していたがコロニーの形成率が対照群と比較しおよそ半分に減少していた。又 Oct-3A 安定導入株では対照群・野生株の 2 倍以上の高発現株はみられなかったが、Oct-3B 導入株では 5 倍以上の高発現株が得られ、両者の ES 細胞での機能は異なると示唆された。発現ベクターをカニクイザル ES 細胞で一過的過剰発現させると、導入後 24~48 時間で、Oct-3A 導入株で内胚葉系と中胚葉系のマーカー遺伝子の発現が上昇した。Oct-3A, Oct-3 の両者とも過剰発現で霊長類 ES 細胞の自己複製を妨げるが、未分化状態の維持にはマウスの Oct-3 と同様 Oct-3A の厳密な発現量の

制御が重要であることが示唆された。

霊長類 ES 細胞における遺伝子発現制御系の確立

ヒトを含めた霊長類 ES 細胞の未分化性維持や細胞分化にかかわる分子機構を解析する上で、外来遺伝子を必要な時に必要な量だけ発現させる、遺伝子発現制御システムは非常に重要であるが、霊長類 ES 細胞の遺伝子操作が困難であったり、導入遺伝子の発現が不安定であったりすることもあり、マウス ES 細胞と異なり確立されたものではなかった。そこで我々はまずサル ES 細胞を用いて遺伝子発現制御系の構築をおこなった。Tet-Off 遺伝子発現制御系を導入したサル ES 細胞ではドキシサイクリンにより目的遺伝子の発現の On/Off 制御を未分化状態や胚様体 (EB) やテラトーマなどの分化状態でも確認できた(図)。さらにこれらの樹立した細胞株は ES 細胞の特性を保持していることも確認した。



図：サル ES 細胞での GFP 遺伝子の発現制御
ドキシサイクリンの濃度に依存して GFP タンパク質の発現が抑制されている。

高クローニング効率を示すヒト ES 細胞サブラインの確立と解析

ヒト ES 細胞は継代維持を行う場合、常に一定以上のサイズの細胞集団として取り扱う必要がある。また、継代操作の過程での細胞死も比較的多く観察される。これらのことがヒト ES 細胞の安定的な継代培養を難しいものにしていて考えられている。この問題の一つの解決策としてより安定的に継代できるサブラインの単離が可能かどうかを検討した。我々は、ある特定の条件下で継代維持を継続することで、KhES-1 細胞株について再現性よく継代維持を効率よく行うことが可能なサブラインが得られることを見いだした。得られたサブラインは元の細胞よりも非常に高いクローニング効率(20% 程度)を示した。すなわち、細胞を一つ一つにまでバラバラにして継代操作を行っても、細胞死や細胞分化をあまり起こさず未分化な細胞として増殖することが可能であった。

これにより、ヒト ES 細胞の継代維持が飛躍的に簡便化されるだけでなく、通常 1 週間に 10 倍程度にしか増殖させることができなかったヒト ES 細胞を 50-100 倍程度にまで効率を向上させることが可能となった。このような細胞株が異常を持つかどうかを核型分析により調べたところ、親株の同様の正常な核型を示した。従って、クローニング効率の上昇は染色体異常のような大規模な遺伝子異常を伴わないことが明らかになった。このような細胞株はヒト ES 細胞研究に非常に有用なリソースになると考えられる。

Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.

Establishment and analysis of human ES cell lines.

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture re-

taining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established three human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 20 laboratories. We also developed a new bulk-passaging technique that preserves the karyotypic integrity of human ES cell lines when maintained in culture for up to two years. Finally, we show that a simplified vitrification cryopreservation technique is vastly superior to standard slow-cooling methods with respect to cell viability. These results provide valuable information towards the goal of large-scale human ES cell culture required for the application of human ES cells to disease therapy.

Function of Oct-3 isoforms in cynomolgus monkey ES Cells.

Oct-3 is a key molecule for maintaining self-renewal in mouse ES cells. The function of Oct-3 in primate ES cells was not clear. We cloned two splicing isoforms of Oct-3, Oct-3A and Oct-3B, from cynomolgus monkey ES cells, and found that they have high homology to human Oct-3A and Oct-3B. To examine their function, Oct-3A and Oct-3B were overexpressed in cynomolgus monkey ES cells. Transient Oct-3A overexpression induced ES cell differentiation into endodermal and mesodermal lineages and disrupted proliferation of undifferentiated monkey ES cells. In contrast, Oct-3B overexpression did not induce differentiation of monkey ES cells. These findings indicate that a certain Oct-3A expression level has an important role in sustaining self-renewal in non-human primate ES cells.

Establishment of the gene-inducible system in primate es cell lines.

Generation of a gene-inducible system regulatable in primate ES cells would serve as a powerful tool for basic research and clinical applications of primate ES cells. We established a Tet-Off gene-inducible system in monkey ES cell lines. Such manipulated cells maintained ES cell characteristics, and inducible gene expression in both the stem cells and differentiated cells could be reliably controlled by doxycycline (Dox) administration.

Establishment of human ES cell sub-lines with high cloning efficiency.

Human ES cells exhibit pluripotency and indefinite proliferation, and are a potential source of cells for transplantation therapies and drug discovery. These applications will require large amounts of human ES cells. However, human ES cells are difficult to culture and maintain at larger scales, in part because of their low resistance to dissociation during passaging. To circumvent this, we developed a simple and easy method for establishing human ES cell sub-lines tolerant of complete dissociation. These cells exhibit high cloning efficiency and also high cloning efficiency, and they maintain their ability to differentiate into the three germ layers. Several sub-lines have no detectable amplifications or deletions in their karyotypes, and they retained their characteristics under feeder-free culture conditions and after freeze-thawing. Thus, these human ES cell sub-lines would be valuable for human ES cell applications.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Keiko Adachi, Eihachiro Kawase, Kentaro Yasuchika, Tomoyuki Sumi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori. Establishment of the Gene-Inducible System in Primate Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*, 24, 2566-2572

(2006).

Shin-ya Yasuda, Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Kouichi Hasegawa, Takashi Tada, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer. *Genes to Cells*, 11, 1115-1123 (2006).

Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka, Yukio Nakamura, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori. A method for the selection of human embryonic stem cell sub-lines with high cloning efficiency. *Stem Cells*, 24, 2649-2660 (2006).

Yasuko Fujimoto, Kouichi Hasegawa, Hirofumi Suemori, Juichi Ito and Norio Nakatsuji. Molecular Cloning and Function of Cynomolgus Monkey Oct-3 Isoforms in Primate Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 15, 566-574 (2006).

Hirofumi Suemori, Kentaro Yasuchika, Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka, Norihiro Tsuneyoshi and Norio Nakatsuji. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 926-932 (2006)

Kouichi Hasegawa, Shinichiro Chuma, Takashi Tada, Takayuki Sakurai, Masaru Tamura, Hirofumi Suemori and Norio Nakatsuji. Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341, 369-375 (2006)

Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shinoda G, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DH, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T. Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*, 24, 1348-1358 (2006)

Hirofumi Suemori, Kentaro Yasuchika, Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka, Norihiro Tsuneyoshi and Norio Nakatsuji. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 926-932 (2006)

Kouichi Hasegawa, Shinichiro Chuma, Takashi Tada, Takayuki Sakurai, Masaru Tamura, Hirofumi Suemori and Norio Nakatsuji. : Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 341, 369-375 (2006)

Katsutsugu Umeda, Toshio Heike, Momoko Yoshimoto, Gen Shinoda, Mitsutaka Shiota, Hirofumi Suemori, Hong Yuan Luo, David H.K. Chui, Ryuzo Torii, Masabumi Shibuya, Norio Nakatsuji, Tatsutoshi Nakahata. : Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*, 24, 1348-1358 (2006)

2) 著 書

Hirofumi Suemori, Yoshiki Sasai, Katsutsugu Umeda and Norio Nakatsuji. ES cell lines from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). in "Embryonic Stem Cells, A Practical Approach" (Oxford University Press, NY, USA) 2006.

3) 総 説

末盛博文：ES細胞と再生医療。医学の歩み「再生医学臨床と研究の最前線」217, 576-581 (2006)

高田 圭, 末盛博文：ヒト胚性幹細胞の樹立とそのバンク事業の概要。分子細胞治療5, 252-256 (2006)

末盛博文：ヒト胚性幹細胞。バイオテクノロジージャーナル6, 702-706

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

恒吉法尋, 安田晋也, 角 智行, 長谷川光一, 多田 高, 中辻憲夫, 末盛博文: NANOG is an essential factor for undifferentiated proliferation of monkey ES cells. Joint Forum (IFMS, IMEG, CDB) 2006.10.10

安達啓子, 川瀬栄八郎, 安近健太郎, 角 智行, 中辻憲夫, 末盛博文: Establishment of the Tet-Off gene-inducible system in monkey embryonic stem cell lines. Joint Forum (IFMS, IMEG, CDB) 2006.10.10

Shin-ya Yasuda, Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Kouichi Hasegawa, Takashi Tada, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori.: Nanog is sufficient for self-renewal of primate ES cells. ISSCR Tronto, Canada. 2006.6.27-7.1

Keiko Adachi, Eihachiro Kawase, Kentaro Yasuchika, Tomoyuki Sumi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori.: Establishment of the Gene-Inducible System in Primate Embryonic Stem Cell Lines. ISSCR Tronto, Canada. 2006.6.27-7.1

Shin-ya Yasuda, Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Kouichi Hasegawa, Takashi Tada, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori.: Nanog is sufficient for self-renewal of primate ES cells. IUBMB Congress Kyoto. 2006.6.13-6.23

Keiko Adachi, Eihachiro Kawase, Kentaro Yasuchika, Tomoyuki Sumi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori.: Establishment of the Gene-Inducible System in Primate Embryonic Stem Cell Lines. IUBMB Congress Kyoto. 2006.6.13-6.23

Kouichi Hasegawa, Hirofumi Suemori and Norio Nakatsuji.: Establishment, Self-renewal Mechanism, and Preclinical Application of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells. First German-Japanese Symposium on "Nonhuman Primates: Embryonic Stem Cells and Transgenesis" The German Primate Center, Gottingen, Germany. 2006.3.13-14

Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka, Yukio Nakamura, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori.: Establishment of human embryonic cell sub-lines showing high cloning efficiency. 2006 Keystone Symposia, Stem cells. Whistler Resort, Whistler, British Columbia, Canada. 2006.3.27-4.1

2) 講演・シンポジウム

末盛博文: ヒト ES 細胞株の樹立とその利用. 埼玉医科大学卒後教育委員会 学術集会(特別講演)埼玉県 2006.2.6

末盛博文: ヒト ES 細胞研究の現状と展望. 第 5 回日本再生医療学会 岡山市 2006.3.8

末盛博文: ヒト ES 細胞の培養維持と凍結保存技術等の最新状況. 第 1 回ヒト ES 細胞研究交流会 京都市 2006.3.27

末盛博文: ヒト ES 細胞株の樹立と培養. 医薬品基盤研究所 ヒト ES 細胞の使用研究に関する講習会 2006.6.20

末盛博文: ヒト ES 細胞研究の現状と課題. 第 15 回硬組織再生生物学会(特別講演)京都市 2006.9.16.

末盛博文: ヒト ES 細胞 リソースとしての現状と将来 第 78 回日本遺伝学会 ナショナルバイオリソースシンポジウム 2006.9.27

末盛博文: ヒト ES 細胞株の樹立と利用の現状. 鳥取大学医学研究科 2006.11.2



幹細胞分化制御研究領域 Laboratory of Stem Cell Differentiation

分野主任 助教授 山下 潤

Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

【研究概要】

幹細胞分化制御研究領域では、ES 細胞(胚性幹細胞:embryonic stem cells)を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。

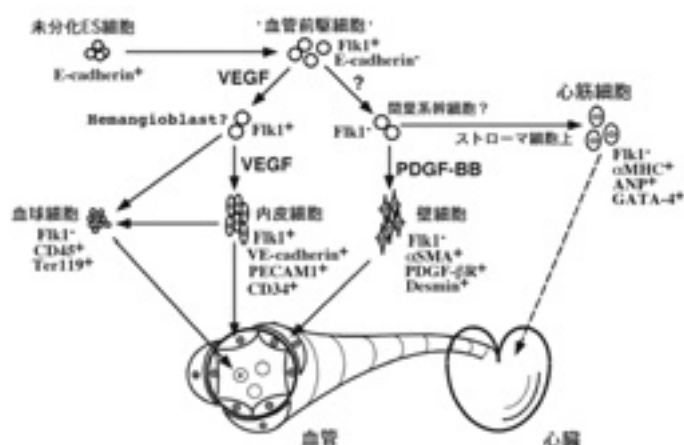
血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGF の受容体の一つである Flk1 は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES 細胞を用いて in vitro において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を in vitro および in vivo において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita, *Nature*, 2000.)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導できることも明らかにしている(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。(図)

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、心血管および血球という循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ、心血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより心臓血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討し、ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた。

現在、この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて、以下のようなプロジェクトを遂行及び予定している。

1. ES 細胞 in vitro 分化系を用いた血管細胞分化・多様化の分子機構の解析

1) DNA チップを用いた網羅的血管分化関連遺伝子の同定



- 2) RNA 干渉を用いた *in vitro* 分化遺伝子機能解析系の構築 (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
 - 3) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析 (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006)
 - 4) 物理的刺激的血管内皮分化多様化における意義 (Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005).
2. 誘導血管細胞の血管再生への応用
- 1) 移植におけるドナー細胞の最適な分化段階の決定
分化初期内皮細胞が特異的かつ有効に新生血管に寄与することを明らかにした (Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003).
 - 2) 移植細胞の遺伝子修飾による組織への動員, 生着効率の改善効果の検討
 - 3) 人工生体材料を用いた新しいハイブリッド人工血管の開発 (Huang, **J Artif Organ**, 2005).
3. ES 細胞からの心筋細胞の分化誘導
- 1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発 (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
 - 2) 心筋細胞 *in vitro* 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析
 - 3) 新しい心臓再生治療への応用
4. 霊長類 ES 細胞からの心血管分化誘導
- 1) サル ES 細胞からの血管分化誘導
京都大学臨床病態医科学との共同研究により, サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功した (Sone, **Circulation**, 2003).
 - 2) ヒト ES 細胞からの血管分化誘導
京都大学臨床病態医科学申請の輸入ヒト ES 細胞を用いた血管分化研究に参画し, 日本最初のヒト ES 細胞分化研究を開始している.
 - 3) ヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導
ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤, 平成 17 年 3 月 10 日文部科学大臣承認)
ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を開始している.

Main theme of our research : Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells (and somatic cells).

Recently, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita et al. **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, indicating

Cardiovascular Differentiation from ES cell-derived Flk1⁺ cells

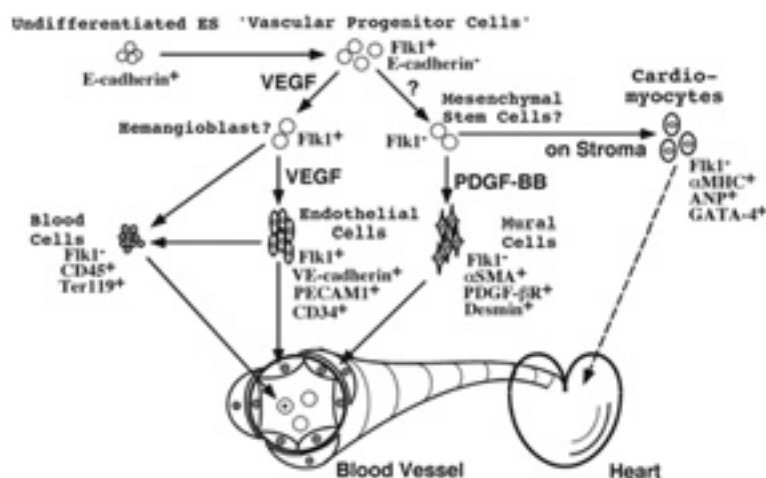


Fig. 1 : Cardiovascular development in ES cell *in vitro* differentiation system

that all of cardiovascular cellular components could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1).

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

Research Projects :

1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of vascular cell differentiation and specification using ES cell *in vitro* differentiation system.
 - 1) Comprehensive molecular cloning of genes for endothelial cell differentiation by global gene expression profile with DNA chip and a novel *in vitro* functional assay system using vector-based siRNA expression (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006).
 - 2) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006).
 - 3) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005).
2. Application of induced vascular cells to vascular regeneration
 - 1) Evaluation of appropriate differentiation stage of donor cells for cell transplantation.

We have demonstrated that Flk1⁺/VE-cadherin⁺ early endothelial cells specifically contribute to blood vessels as endothelial cells, specifically and efficiently, whereas Flk1⁺/VE-cadherin⁻ vascular progenitor cells do not, using cell transplantation to mouse tumor angiogenesis model (Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003).

- 2) Improvement of the efficacy of recruitment, contribution, and survival of donor cells, by modifying gene expressions in donor cells.
- 3) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang, **J Artif Organ**, 2005).

3. Cardiomyocyte induction from ES cells

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Application to cardiac regeneration

4. Cardiovascular differentiation using primates ES cells

- 1) Vascular cell differentiation from monkey ES cells

We have succeeded in vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone, **Circulation**, 2003) (collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).

- 2) Vascular cell differentiation from human ES cells

We have already started research for vascular development using imported human ES cells as collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine. (The first approved human ES cell research in Japan.)

- 3) Cardiomyocyte differentiation using human ES cells

Our human ES cell research project “Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells” has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(*corresponding author)

Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, *in press*

Hiraoka-Kanie M, Miyagishi M, Yamashita JK*. Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 351 : 669-674, 2006.

Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK*. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26 : 1977-1984, 2006.

Kono T, Kubo H*, Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H, Yamashita JK*. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26 : 2070-2076, 2006.

Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Shindoh N, Terada Y, Nagai K, Yamashita JK, Ganesan A, Soest van RW, Fusetani N. Azumamides A-E : Histone Deacetylase Inhibitory Cyclic Tetrapeptides from the Marine Sponge Mycale izuensis. **Angew Chem Int Ed**, 45 : 7553-7557, 2006.

Watabe T, Yamashita JK, Mishima K, Miyazono K. TGF-beta signaling in embryonic stem cell-derived endothelial cells. **Methods Mol Biol**, 330 : 341-51, 2006.

和文総説

- 山下 潤. 「血管内皮細胞分化多様化のメカニズム」 実験医学増刊「急速進展する血管研究」 宮園浩平, 佐藤靖史編, p25-p32, 2006. 羊土社
- 山下 潤. 「血管とリンパ管の発生」 渋谷正史編「癌と血管新生の分子生物学」, p15-p26, 2006. 南山堂
- 山下 潤. 「ES細胞を用いた血管分化再生研究」 脈管学, 46: 265-271, 2006.
- 山下 潤. 「胚性幹細胞からの血管分化と再生」 循環器科, 60: 59-65, 2006. 科学評論社

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 柳 賢徳, 山下 潤. ES 細胞由来心筋ペースメーカー細胞の自動能維持におけるイオンチャネル HCN1, 4 および Cav3.1 の意義. 日本心血管内分泌代謝学会. 2006.11.18. 福井
- Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK. In vitro functional analysis of genes for differentiation using inducible short hair-pin RNA expression system in embryonic stem cells. The 19th Naito Conference. Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III]. (poster) 2006.11.15. Shonan, Kanagawa
- 山下 潤. 「ES 細胞を用いた動静脈リンパ管分化機構の解析」 Molecular Cardiovascular Conference. 2006.9.8, 小樽
- 蟹江美奈, 山下 潤. 「ES 細胞における誘導性 shRNA 発現系を用いた in vitro 遺伝子機能解析システム」 第 27 回 日本炎症再生学会, 2006.7.11. 東京
- 山下 潤. 「ES 細胞を用いた心血管分化再生研究」 Tanabe Medical Frontier Conference, 2006.7.1. 軽井沢
- Yurugi-Kobayashi T, Schroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway activates Notch signaling and induces arterial endothelial cell differentiation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (poster). 2006.6.22. Kyoto.
- Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK. In vitro functional analysis of genes for cell differentiation using inducible short hair-pin RNA expressing-embryonic stem cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (poster). 2006.6.22. Kyoto.
- 山下 潤. 「構成的アプローチによる新しい心血管分化再生研究」 京都大学臨床心血管再生研究会, 2006.2.8. 京都

2) 講演・シンポジウム

- Yurugi-Kobayashi T, Shroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells. 第 4 回日韓血管生物学シンポジウム(招請講演). 2006.12.13. 東京
- 山下 潤. In vivo における移植細胞分化誘導 —ES 細胞を用いた構成的発生生物学の視点から—. 第 44 回日本人工臓器学会ワークショップ「治療力を利用した in vivo tissue engineering」(招請講演) 2006.11.1. 横浜
- 山下 潤. ES 細胞を用いた心血管分化再生研究. 第 12 回 KIX Cardiac Symposium. (招請講演) 2006.10.11. 大阪
- Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. XIVth International Vascular Biology Meeting (Invited) 2006.6.8. Noordwijkerhout, Netherlands.
- Yamashita JK. Mechanisms of vascular diversification: An approach from constructive developmental biology using

ES cells. 第 39 回日本発生生物学会ワークショップ“Frontiers in Vascular and Lymphatic Development.”(organizer) 2006.5.31. 広島

小林(万木)貴美, Shroeder T, 伊藤 裕, 中尾一和, 西川伸一, 山下 潤. 血管内皮分化および動静脈分化におけるアドレノメデュリン/サイクリック AMP 系の意義. 日本循環器学会シンポジウム. 2006.3.24. 名古屋

幹細胞加工研究領域 Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 助教授 多田 高
Assoc. Prof. Takashi Tada

【研究概要】

体細胞はその世代を支えるために特殊化した細胞である。ゲノム再プログラム化とは、すでに運命づけられた体細胞のエピジェネティクスを消去し、未分化細胞のエピジェネティクスを上書きする事により多能性を獲得する現象である(図 1 上段)。体細胞核移植クローン動物が応用例として知られる。我々は世界に先駆け体細胞と胚性幹(ES; Embryonic Stem)細胞との細胞融合により体細胞核が再プログラム化され多能性を獲得することを発見した。この結果は、ES 細胞が体細胞を再プログラム化する活性をもち、ES 細胞から再プログラム化に必要な因子の同定が可能である事を明確に示している。無限に増殖する ES 細胞は因子同定に十分量の試料を提供してくれるばかりではなく、培養条件下で遺伝子改変を加えた ES 細胞を用いて体細胞を再プログラム化する可能性を提供している。ヒト ES 細胞研究をも見据え、1)ゲノム再プログラム化分子機構の解明、2)体細胞由来個人対応型(テラーメイド)幹細胞の作製をめざして鋭意研究を進めている。

ゲノム再プログラム化の分子機構) ES 細胞との細胞融合による再プログラム化に伴い、体細胞ゲノムは特有の堅いクロマチンがゲノム全体で変化し、未分化細胞特有の緩いクロマチンに変化する。その過程は、体細胞エピジェネティクスの消去と未分化細胞エピジェネティクス確立の少なくとも 2 段階が必要と推測され、各プロセスに働く機構や因子の解析を行っている。クロマチン変化をヒストン置換の可視化によりとらえる事を目的に、ヒストン-GFP トランスジェニックマウスの作製を進めている。

ゲノム再プログラム化鍵因子 Nanog と細胞周期) 細胞の未分化性維持に働く鍵因子として同定された *Nanog* 遺伝子は、ホメオドメインをもつ転写因子である。未分化細胞に特異的に発現する *Nanog* はゲノム再プログラム化に伴い、体細胞核から再活性化する。*Nanog* の発現は、転写開始点の上流約 200 bp に存在する Octamer/Sox 配列を介した他の未分化維持因子 Oct4 や Sox2(または Sox 関連因子)により制御されることを示してきた。一方、*Nanog* 蛋白質は翻訳後に細胞内で高度にリン酸化されることを突き止めた。リン酸化は細胞周期の M 期に著しく、*Nanog* タンパク質の N 末端に存在するセリン残基が Cdk1 リン酸化酵素によって修飾されていた。

マウス融合細胞核からの染色体除去) ES細胞との細胞融合により体細胞ゲノムは再プログラム化され, ES細胞様に変化する。しかし, 融合細胞は4倍体であるため2倍体化するための技術が望まれていた。我々は, 融合細胞からES細胞由来の望んだ染色体を選択的に取り除く技術を開発した。ES細胞の取り除きたい染色体に組み換えDNA配列(染色体除去カセット)を組み込む。このES細胞と体細胞を細胞融合した後に組み換え酵素で処理すると, DNA複製後にあたるS期後半やG2期に姉妹染色分体間で組み換えが起こる。組み換え染色体は細胞分裂に好ましくない形に変化し核から排除される。結果として, 染色体除去カセットで印された染色体のみが融合細胞核から除去される(図1下段)。ES細胞由来の第6番染色体(*Nanog* 遺伝子運ぶ)を取り除き, 体細胞由来の第6番染色体のみにした融合細胞でも未分化性が維持された。再プログラム化により再活性化した体細胞由来の*Nanog*のみで融合細胞の未分化性が維持できることを示した。開発された染色体除去法を用いて, 融合細胞の2倍体化に挑んでいる。

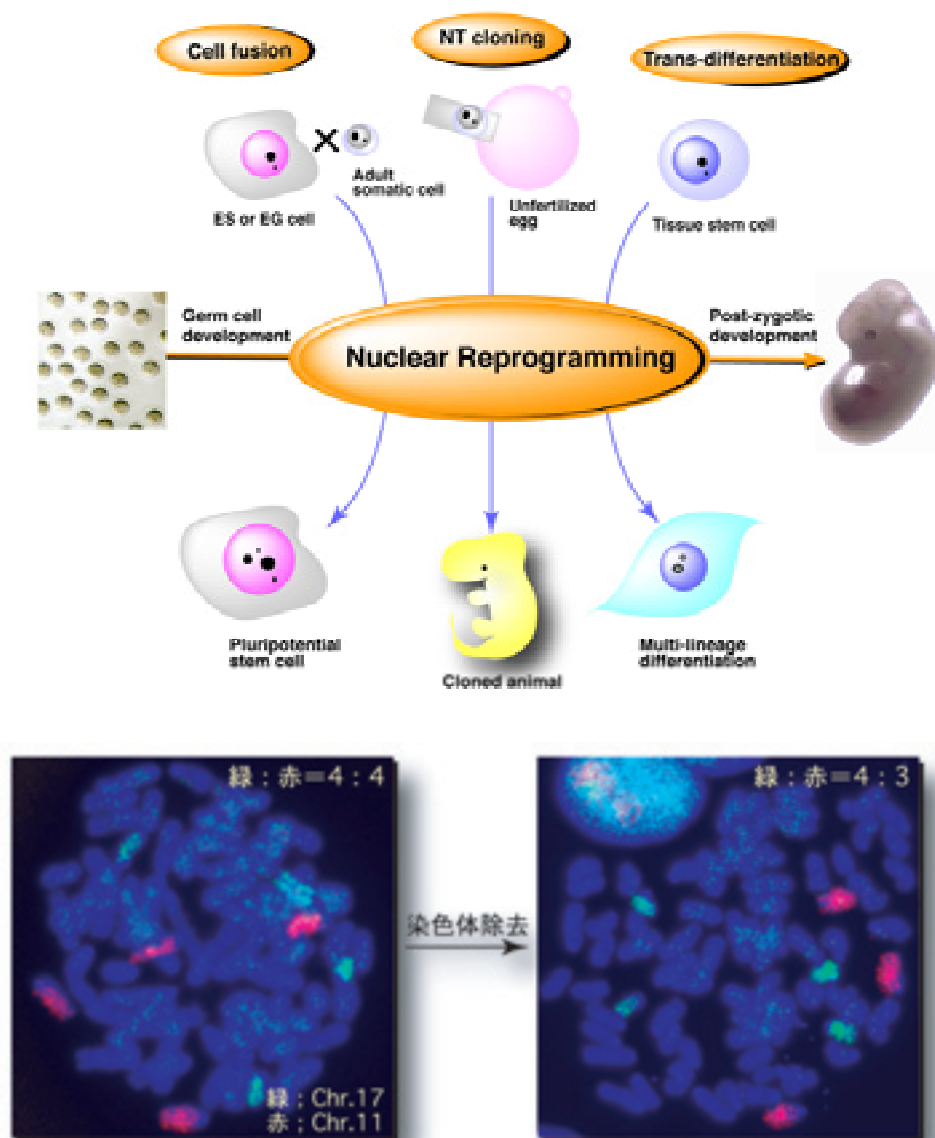


図1. 体細胞ゲノムの再プログラム化とES細胞染色体の選択的除去

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Those cells are basically classified into two types of cells ; somatic cells and germ cells. Determination of cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. Recent development of a technology of embryo manipulations achieves epigenetic reprogramming by nuclear transplantation of a somatic cell to enucleated oocytes as seen by production of cloned animals in many mammalian species. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell. Cell fusion technology may, therefore, have potential to make an important contribution to personal therapeutic applications with no contribution of therapeutic cloning.

Reprogrammed somatic genomes through cell fusion with ES cells function equivalent to the ES genomes in differentiated cells. We have demonstrated that the acquisition of pluripotential competence by a reprogrammed somatic genome is accompanied, independent of gene activity, by global de-condensation of the somatic cell-derived chromatin. Thus, we have proposed that two epigenetic events ; erasure of somatic cell memory and establishment of pluripotential cell memory are required to complete the nuclear reprogramming. To visualize kinetics of chromatin structure by the nuclear reprogramming ,we have tried to make transgenic mouse and cell lines with living color gene-tagged histone and histone variants

Nanog is a homeodomain-bearing transcriptional factor identified as a pluripotential cell-specific gene. Our data clearly demonstrated that *Nanog* was essential for maintaining pluripotency of stem cells and inducing successful nuclear reprogramming of somatic nuclei through cell fusion and nuclear transplantation. *Nanog* expression was controlled by an adjacent pair of highly conserved Octamer- and Sox-binding sites at about 200 bp upstream of the transcriptional starting site. Other important stem cell factors, Oct4 and Sox2 were capable of binding to the Octamer and Sox elements, respectively, indicating that Nanog, Oct4 and Sox2 are key players in maintaining pluripotency in the molecular network of stem cells. Interestingly, the Nanog protein was highly phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. The serine residues clustered at the N-terminal of Nanog were phosphorylated in M phase of the cell cycle through the activity of the protein kinase of Cdk1.

Hybrid cells between ES cells (2n) and somatic cells (2n) are tetraploid (4n). To produce personalized diploid stem cells from the tetraploid hybrid cells, it is necessary to eliminate the ES cell-derived chromosomes once the somatic genome has been reprogrammed. To eliminate ES-derived chromosomes from hybrid nuclei, we newly designed a chromosome elimination cassette (CEC). Cre-mediated sister-chromatid recombination in late S and G2 phases of the cell cycle should generate di-centric and nulli-centric chromosomes specific to CEC-tagged chromosomes. Such aberrant chromosomes are spontaneously deleted from cells during cell division. Hybrid cells missing ES cell-derived chromosome 6 containing the *Nanog* gene indicated that the reprogrammed somatic cell-derived *Nanog* gene is sufficient for maintaining the undifferentiated state of hybrid cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N., Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei. *Nat. Method* (in press)
- Yasuda, S., Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Hasegawa, K., Tada, T., Nakatsuji, N., Suemori, H.: NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer. *Gene. Cell* **11**: 1115-1123 (2006)
- Popova, B.C., Tada, T., Takagi, N., Brockdorff, N., Nesterova, T.B.: Attenuated spread of X-inactivation in an X; autosome translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**: 7706-7711 (2006)
- Tada, T.: Toti-/Pluripotent Stem Cells and Epigenetic Modifications. *Neurodegenerative Diseases*, **3**: 32-37 (2006)
- Hasegawa, K., Chuma, S., Tada, T., Sakurai, T., Tamura, M., Suemori, H., Nakatsuji, N.: Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 369-375 (2006)

2) 著 書

- Tada, M., Tada, T.: Electrofusion: Nuclear reprogramming of somatic cells by cell hybridization with pluripotent stem cells. In "Cell Biology: A Laboratory Hand Book, 3rd Edition, Volume 1" ed. by Julio E. Celis. (Academic Press, USA), pp199-205 (2006)
- Tada, T.: Nuclear Reprogramming. In "Methods in Molecular Biology, Vol.348: Nuclear Transfer Protocols: Cell Reprogramming and Transgenesis" ed. by Paul J. Verma and Alan O. Trounson (Humana Press, USA), pp229-236 (2006)

3) 総 説

- 多田 高: ゲノム再プログラム化—ES細胞の再プログラム化活性の応用, 「再生医学臨床と研究の最前線」(梅澤明弘, 小室一成 企画) pp529-535 (医学のあゆみ, 217 巻 5 号, 医歯薬出版株式会社, 2006)
- 多田 高: 体細胞核再プログラム化とエピジェネティクス, 増刊号「ゲノムワイドに展開するエピジェネティクス医科学」(中尾光善, 塩田邦郎, 牛島俊和, 佐々木裕之 編集) pp158-164 (実験医学, 24 巻 8 号, 羊土社, 東京, 2006)
- 多田 高: リプログラミングと核クロマチン構造, 「細胞核の世界—ダイナミクスから病態まで」(米田悦啓, 木村宏, 五十嵐和彦, 中尾光善 編集) pp2060-2063 (蛋白質・核酸・酵素, 51 巻 14 号, 共立出版, 東京, 2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N., Surani, M.A., Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells after nuclear reprogramming, Keystone Symposium-Stem Cells- (2006.3.27-4.1, Whistler, Canada)

黒田貴雄, 木村博信, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 未分化性維持因子 NANOG の細胞周期依存的リン酸化:
平成 18 年度特定領域研究 公開班会議「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構」(2006.5.18-19, 東京)

三瀬名丹, 近藤昌代, 杠美佐子, 目加田和之, 池 郁生, 多田 高, 小川毅彦, 金谷重彦, 野瀬俊明, 阿部訓也:
マウス胚性幹細胞(ES)・胚性生殖(EG)細胞の遺伝子発現様式と性染色体構成の関連に関する解析: 日本発
生生物学会第 39 回大会(2006.6.1-3, 広島)

尾辻智美, 多田政子, 松村寛行, 鈴木達也, 中辻憲夫, 多田 高: ES 融合細胞からの選択的複数染色体の除去技
術開発: 日本発生生物学会第 39 回大会(2006.6.1-3, 広島)

Kuroda, T., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., Tada, T.: Cell cycle-dependent phosphorylation of NANOG, 20th
IUBMB International congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress (2006.6.18-
23, Kyoto JAPAN)

Otsuji, T., Tada, M., Matsumura, H., Nakatsuji, N., Tada, T.: Targeted elimination of various combinations of ES cell
chromosomes from pluripotential hybrid cells, 20th IUBMB International congress of biochemistry and molecu-
lar biology and 11th FAOBMB congress (2006.6.18-23, Kyoto JAPAN)

多田 高: ゲノム再プログラム化と核クロマチンダイナミクス: 第 3 回「細胞核ダイナミクス」班会議 (2006.7.24
-26, 大阪)

黒田貴雄, 木村博信, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 未分化性維持因子 NANOG の細胞周期依存的リン酸化:
第 4 回 COE リエゾンラボ研究会(2006.8.28-29, 熊本)

黒田貴雄, 木村博信, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 未分化性維持因子 NANOG の細胞周期依存的リン酸化:
第 78 回日本遺伝学会(2006.9.25-27, 筑波)

Matsumura, H., Tada, M., Hirano, K., Nakatsuji, N., Tada, T.: Epigenotype of reprogrammed somatic chromosomes
by cell fusion with embryonic stem cells: International Genomic Imprinting Workshop 2006 (2006.11.30-12.1,
Tokyo JAPAN)

黒田貴雄, 木村博信, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 未分化性維持因子 NANOG の細胞周期依存的リン酸化:
日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」(2006.12.6-8, 名古屋)

松村寛行, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 再プログラム化と染色体除去による MHC 個人適応型融合細胞: 日
本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」(2006.12.6-8, 名古屋)

2) 講演・シンポジウム

多田 高: 細胞融合による体細胞再プログラム化と染色体除去: 京都大学再生医科学研究所平成 18 年度学術講演
会(2006. 10. 11, 京都)

細胞プロセッシング研究領域 Laboratory of Cell Processing

客員教授 高橋 恒夫

Visiting Prof. Tsuneo A. Takahashi

【研究概要】

細胞プロセッシング研究領域は、ヒト ES 細胞の臨床応用を目指しその基盤技術の研究開発を行うべく、2005 年度に新設された部門である。ES 棟地下に細胞処理施設(CPC : Cell Processing Center)を設置し、その管理を行うとともに、臨床応用可能な医薬品 GMP に準拠したヒト ES 細胞リソースの供給を目指し、その基盤技術の研究開発を行っている。

2006 年度は、ES 棟内地下に CPC の設計設置を行った。CPC は空調管理、清浄度管理、及び作業管理上、医薬品 GMP ハードに準拠した施設としており、CPC 内には、1 系統の細胞調製室の他、細胞保存室、閉鎖系として独立して細胞調製、培養が可能な Cell-processing Isolator システムを 1 系統導入している。施設、機器類の整備に伴い、2006 年 11 月には、霊長類胚性幹細胞研究領域と共同で、幹細胞医学研究センターのヒト ES 細胞株の樹立研究施設としての申請を行った。政府による確認の後、順次樹立研究を開始する予定である。

今後、樹立研究を通じ、臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築すると共に、臨床応用に使用可能なレベルのヒト ES 細胞由来の細胞リソースの臨床研究施設への提供と、将来の臨床用ヒト ES 細胞バンクの可能性の探索を目指す。

この他、ヒト ES 細胞株のより適切な品質管理体系の確立の為に、その凍結保存過程に着目し、温度制御ステージつき顕微鏡を用いたカニクイザル ES 細胞コロニーの凍結解凍過程の解析、及び DSC(示差走査熱量計)を用いた熱力学的解析を通じた、細胞、コロニーレベルでの凍結解凍現象の理論化、凍結解凍条件の最適化の検討を試みている。

The Laboratory of Cell Processing was established in the fall of 2005 to develop basic technologies to produce and supply clinical grade human embryonic stem cells (hES cells). The Cell Processing Center (CPC), located at the underground level of the ES building, is intended to supply hES cells at medical Good Manufacturing Practices (GMP) standards for clinical application and to perform basic research important to the field.

In 2006, the construction of the CPC, including air-conditioning, purity and production control management systems compliant with medical GMP, was completed. This facility includes one regular cell processing room, one cell preservation room and one room for Cell-processing Isolation systems, which allow for culturing and processing of cells in a closed environment.

In November 2006, in cooperation with the Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, we requested the Government approve the facility and equipment for their intended purpose and allow us to begin operations.

Once operation begins, we plan to develop culture and processing methods, quality assurance and safety standards that will allow us to ensure only clinical grade hES cells will be provided to researchers and clinicians. We also will initiate the banking of hES cell lines.

One important aspect of our research is to develop a cryopreservation protocol that will significantly increase the recoveries of hES cells over the current low levels. For this project we will utilize a cryomicroscope equipped with a temperature controlling stage to observe, and a differential scanning calorimeter to measure, the effect of heat transfer on the cells during freezing and thawing. First, we will refine our methods with single monkey ES cells and then colonies and when the techniques have been refined and validated we will expand the investigation to hES cells. We expect this strategy will allow us to develop an optimal cryopreservation protocol for hES cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

和文総説

末盛博文，高田 圭，細胞バンク・ヒト ES 細胞：分子細胞治療，5(3)：54-58，2006．先端医学社



再プログラム化研究領域

Laboratory of Reprogramming Research

客員教授 鳥居 隆三

Visiting Prof. Ryuzo Torii

【研究概要】

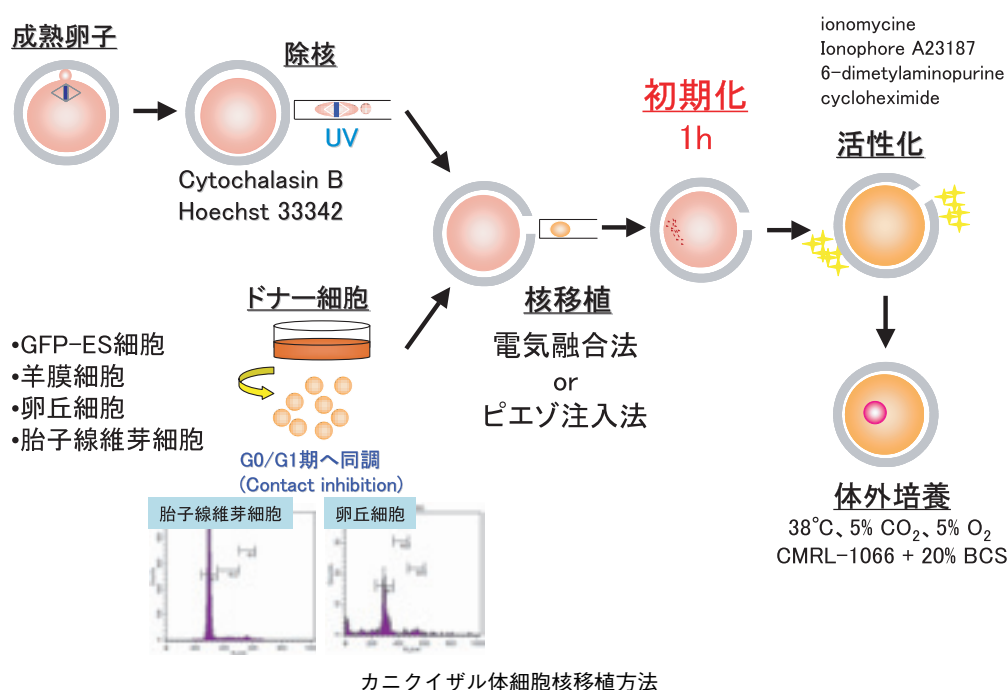
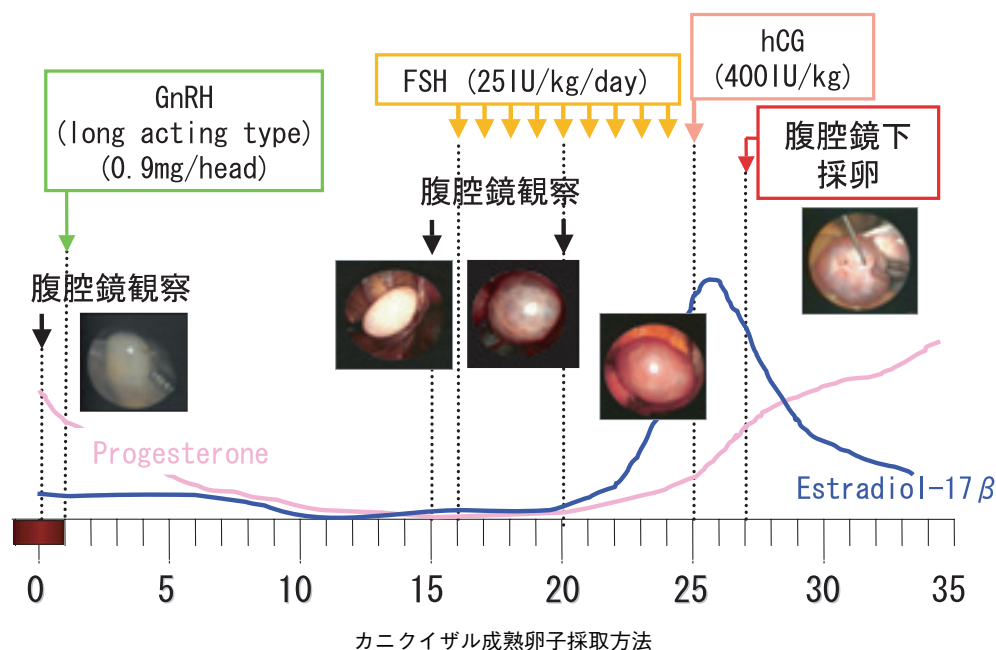
カニクイザルの体細胞核移植法によるクローン胚作成について，以下の項目について基礎的成績の収集を行った．

1) 卵巣刺激法と成熟未受精卵子の採取法に関する検討

質の良い成熟未受精卵子をより多く採取するための性腺刺激ホルモンの種類と投与量について，腹腔鏡による卵巣の形態観察，および未成熟未受精卵子の体外培養法(IVM：in vitro maturation)の方法の検討を行った．その結果，FSH 投与前，投与 4 日目にそれぞれ腹腔鏡観察によって卵胞観察を行い発育状況によって投与量を増減させることにより，多くの成熟卵子を得られることが分かった．

2) 核移植法の検討

体細胞核移植を行うための，除核，核移植，薬物による活性化法について，とくに未成熟染色体凝集；PCC(pre mature chromosome condensation)と単為発生胚(parthenogenesis)の発生を指標として検討した．その結果，核移植後 1 時間目で PCC が形成されること，体細胞核移植法として電気融合法，細胞質内注入法それぞれに至適な細胞の種類があることが分かった．



1. Research abstract :

The following basic results were obtained for cloned embryo production in the crab-eating (cynomolgus) monkey (*Macaca fascicularis*) using the somatic cell nuclear transfer (SCNT) method :

1) Studies of methods for stimulating the ovary and collecting unfertilized mature eggs

Studies were carried out using laparoscopic observation of the ovarian morphology and in vitro maturation (IVM) of unfertilized, mature eggs to identify the ideal gonadotrophin type and dosage for obtaining larger numbers of good quality unfertilized eggs. These studies showed that adjustment of FSH dosage up and down based on laparoscopic observation of follicular development carried out before dosage and on day 4 of dosage provided many mature eggs.

2) Studies of nuclear transplantation methods

Enucleation, nuclear transplantation, and drugs were studied as activation methods for carrying out SCNT, paying particular attention to premature chromosome condensation (PCC) and parthenogenesis indicators. These studies showed that, for PCC formation 1 hour after transplantation, SCNT by electrical fusion and intracellular injection produced ideal cell types.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Takada T, Torii R. Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, in press.

◆ 学会等の講演 ◆

岩谷千鶴, 山崎樹里, 土屋英明, 岡原則夫, 成田純子, 高田達之, 鳥居隆三(2006) 卵胞発育誘起を施したカニクイザルから採取した卵子の性状, 第53回日本実験動物学会総会, 神戸.

Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara N, Terakado I, Narita J, Torii R. (2006) Evaluation of various gonadotropins for oocytes collection in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), The XIIth AAAP Animal Science Congress 2006, Busan, Korea.

山崎樹里, 岩谷千鶴, 岡原純子, 土屋英明, 鳥居隆三(2006) カニクイザル卵子の体外成熟培養, 第92回関西実験動物研究会, 京都.

附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

Prof. Akihiro Kusumi

【研究概要】

1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、これらの分子の活性化(反応)までをも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス/ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー-ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した(図1, 2参照)。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

[Summary of Research]

Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both

membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane



図 1

細胞膜の3次元構造を電子顕微鏡で可視化したもの。赤-青の立体メガネで見ると、細胞膜の内側表面の構造がよく見える。クラスリン被覆ピット、カベオラ、アクチン膜骨格などの構造が見えている。電子線トモグラフィ法では、これらの構造の絶対座標が、約0.5nmの精度で求められた。

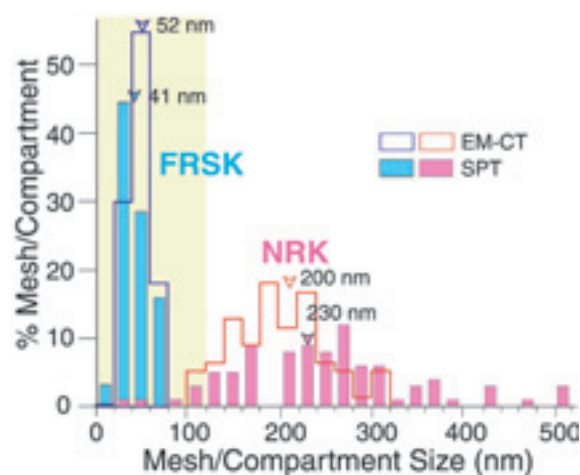


図 2

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤が NRK 細胞、青が、FRSK 細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002 ; Murase et al., 2004 ; Kusumi et al., 2005 ; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labeled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET ; Murakoshi et al., 2004 ; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- W. K. Subczynski, A. Wisniewska, A. Kusumi, and R. N. McElhaney. Effects of pH-induced variations of the charge of the transmembrane α -helical peptide ac-k2(1a)12k2-amide on the organization and dynamics of the host dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1720, 99-109 (2006).
- N. Morone, T. K. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174, 851-862 (2006).
- W. K. Subczynski, A. Wisniewska, J. S. Hyde, and A. Kusumi. Three-dimensional dynamic structure of the liquid-ordered domain in lipid membranes as examined by pulse-EPR oxygen probing. *Biophys. J.* (2006) in press.

2) 書 籍

なし

3) 総 説

小山一本田郁子, 楠見明弘: 「1 分子追跡によって細胞のナノシステムを解く」 光学 35, 76-82 (2006).

中田千枝子, 諸根信弘, 楠見明弘: 「膜骨格: 細胞骨格と細胞膜との相互作用」 蛋白質拡散酵素 51 (5 月号増刊) 『細胞骨格と接着』 672-682 (2006).

鈴木健一, 楠見明弘: 「ラフト」 ナノバイオ事典 (2006 年)印刷中

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学 会

1-1) 招待講演

A. Kusumi, T. Fujiwara: Revealing cellular signaling nanosystems using single-molecule tracking. Focus on Microscopy 2006, Perth (Australia) 2006.4.9-12.

楠見明弘: 作業仮説としてのラフトマイクロドメイン 第 6 回蛋白質科学会年会ワークショップ: タンパク質と脂質の綾なす動的超分子構造: 生体膜マイクロドメイン 京都 (2006.4.24-26)

A. Kusumi, R. Kasai: GPCR oligomerization as observed by single-molecule tracking. 12th International Conference on Retinal Proteins, Hyogo (Japan) 2006.6.5-8

A. Kusumi: Direct observation of signal transduction processes using single-molecule nanobiotechnology. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto (Japan) 2006.6.18-23

T. Fujiwara, N. Morone, E. Kajikawa, J. Keen, A. Kusumi: Assembly mechanism for adaptor protein AP2 molecules in clathrin-coated pits as studied by single fluorescent molecule video imaging. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology Kyoto (Japan) 2006.6.18-23

T. Fujiwara: Revealing cell membrane organization using single-molecule tracking techniques. Mini Symposium on “New Trends in Bioscience” SBD-NCRC 2006 annual workshop, POSTECH, Pohang (Korea) 2006.7

T. Fujiwara, N. Morone, E. Kajikawa, J. Keen, A. Kusumi: Regulation mechanism for the assembly of adaptor protein AP2 molecules in clathrin-coated pits as studied by single fluorophore video microscopy. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo (Japan) 2006.9.3-8

T. Fujiwara, A. Kusumi: Compartmentalized movement of lipids in the cell membrane as revealed by single molecule techniques. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, Seoul (Korea) 2006.10

N. Morone, T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, A. Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the cell membrane interface by electron tomography. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo (Japan) 2006.9.3-8

K. Suzuki, T. Fujiwara, M. Edidin, A. Kusumi: Mechanism for raft-based signal transduction as studied by single-molecule tracking. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo (Japan) 2006.9.3-8

- K. Suzuki, T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Hirano, M. Edidin, A. Kusumi : Raft and non-raft molecules undergo very similar diffusion in the time scales between 25 microseconds and 2.5 seconds. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, E. Kajikawa, H. Murakoshi, A. Yoshimura, A. Kusumi : Transient recruitment of the cytoplasmic lipid-anchored molecules at GPI-anchored receptor clusters : single-molecule detection. 50th Biophysical Society Annual Meeting, Salt Lake City (U.S.A) 2006.2.18-22 (Upgraded from Poster Presentation).
- 小山一本田郁子：細胞内シグナル分子の誘導されたラフト場への短寿命リクルート：1分子追跡による研究.第6回蛋白質科学会年会ワークショップ：タンパク質と脂質の綾なす動的超分子構造：生体膜マイクロドメイン 京都(2006. 4)
- C. Nakada, A. Kusumi : Dynamic remodeling of glutamate receptor clusters before and after stimulation. Luncheon seminar sponsored by Nikon : TIRF microscopy with the aid of auto-focussing. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology / 11th FAOBMB Congress, Kyoto (Japan) 2006.6.18-23

1 - 2) 一般発表

- K. Iwasawa, E. Kajikawa, I. Honda-Koyama¹, R. Kasai¹, K. Ritchie, Y. Miwa, A. Kusumi : Single fluorescent molecule tracking of MARCKS on the cytoplasmic surface of the cell membrane. 50th Biophysical Society Annual Meeting, Salt Lake City (U.S.A) 2006.2.18-22.
- K. Iwasawa, E. Kajikawa, I. Honda-Koyama¹, R. Kasai¹, K. Ritchie, Y. Miwa, A. Kusumi : Single fluorescent molecule tracking of MARCKS on the cytoplasmic surface of the cell membrane. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- R. S. Kasai, E. R. Prossnitz, A. Kusumi : Direct estimation of the dimer fraction of GPCR using a single fluorescent-molecule imaging. 12th International Conference on Retinal Proteins, Hyogo (Japan), 2006.6.5-8
- R. S. Kasai, E. R. Prossnitz, and A. Kusumi : Direct estimate of the dimer fraction of a GPCR using a single fluorescent-molecule imaging. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- T. Fujiwara, K. Iwasawa, K. Ritchie, K. Murase, Y. Umemura, H. Yamashita, K. Suzuki, A. Kusumi : Corralling of phospholipids and transmembrane proteins by “fences” and “pickets” in the cell membrane : single-molecule tracking study. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- K. Sakamoto, T. Fujiwara, and A. Kusumi : Detection of transient arrest of lateral diffusion of membrane molecules in single-molecule tracking trajectories. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- Y. Umemura, T. Fujiwara, K. Suzuki, M. Vrljic, Stefanie Y. Nishimura, W. E. Moerner, H. M. McConnell, and A. Kusumi : Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16
- I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, E. Kajikawa, H. Murakoshi, A. Yoshimura, A. Kusumi : Transient recruit-

ment of the cytoplasmic lipid-anchored molecules at GPI-anchored receptor clusters : single-molecule detection. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16

K. Tanaka, T. Fujiwara, K. Suzuki, Xiao-Yuan Shan, A. Kusumi : Compartments and partitioning in a smooth muscle cell membrane as observed by single-molecule tracking of phospholipids. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16

C. Nakada, H. Yoshida, R. Hasegawa, T. Umeda, S. Okabe, A. Kusumi : Single-molecule tracking of the dynamic remodeling of glutamate receptor clusters induced by ligand binding. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) 2006.11.12-16

2) シンポジウム・研究会

2-1) 招待講演

A. Kusumi : Ligand-induced stabilized rafts as a signaling platform for GPI-anchored receptors : A single-molecule tracking study. 2006 FASEB Summer Research conferences Protein Lipidation, signaling, and Membrane Domains, Indian Wells, California (U.S.A), 2006.7.22-27

A. Kusumi : Single-molecule tracking reveals transient nature of molecular interactions in signal transduction. Nature Chemical Biology, The First Annual Symposium "The Chemical Biology of the Cell", Boston (U.S.A) 2006.11.10-11

A. Kusumi : How long does a molecular marriage last, 3 ms, 3 s, or 3 min? The Ringberg Colloquium, Max Planck Society and Nature Cell Biology, Tegernsee (Germany) 2006.12.3-6

I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, E. Kajikawa, R. Iino, H. Murakoshi, A. Yoshimura, T. Kobayashi, A. Kusumi : Transient interlayer interactions of lipid-anchored receptors and signaling molecules in the cell membrane : detection by simultaneous two-color single-molecule tracking. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.

鈴木健一, 楠見明弘 : リガンド結合が誘導するラフトによるシグナル変換 : 一分子追跡による研究, 「グリーンサイエンス特別研究プロジェクト公開シンポジウム」高知(2006. 1.)

笠井倫志, 楠見明弘 : 1 分子追跡による GPCR ダイマー形成の研究 大阪大学蛋白質研究所セミナー : 膜タンパク質のファンクショナルダイナミクス, 先進的膜タンパク質研究 : ロドプシン・GPCR の世界 大阪 (2006. 11)

笠井倫志, 楠見明弘 : 1 分子追跡による GPCR ダイマー形成の研究 視る生物学 : バイオイメージングの最前線と植物学への応用 奈良 (2006.11)

2-2) 一般発表

T. Fujiwara : Hop diffusion of transmembrane proteins and lipids in various cell types as studied by single molecule techniques. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.

T. Fujiwara : Regulation mechanism for the assembly of adaptor protein AP2 molecules in clathrin-coated pits as studied by single fluorescent molecule video imaging. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.

- I. Koyama-Honda, F. Sanematsu, K. Ito, Y. Shimada, Y. Takeda, Y. Ohno-Iwashita A. Kusumi : Single-molecule tracking of cholesterol monomers and clusters in the live cell membrane. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, E. Kajikawa, K. Suzuki, R. Iino, H. Murakoshi, A. Yoshimura, T. Kobayashi, A. Kusumi : Transient interlayer coupling of lipid-anchored receptors and signaling molecules in the cell membrane : detection by high-speed, simultaneous dual-color, single-molecule tracking. EMBO workshop on Cell Membrane Organization and Dynamics, Bilbao (Spain) 2006.6.3-7
- K. Suzuki, T. Fujiwara, M. Edidin, A. Kusumi : Creation of a transient raft-based signaling platform by engaged GPI-anchored receptors. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- Y. Umemura, T. Fujiwara, K. Suzuki, M. Vrljic, Stefanie Y. Nishimura, W. E. Moerner, H. M. McConnell, A. Kusumi : Single-molecule tracking of raftophilic molecules in the compartmentalized plasma membrane. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- Y. Umemura, T. Fujiwara, K. Suzuki, M. Vrljic, S. Y. Nishimura, W. E. Moerner, H. M. McConnell, A. Kusumi : 膜貫通型タンパク質 MHC Class II と GPI アンカー型の拡散運動の比較—1 分子追跡法による研究—, 特定領域「生体膜トランスポート」の分子構築と生理機能」(領域代表：金井好克)平成 18 年度第一回班会議 (2006.9)
- Xiao-Yuan Shan, K. Ritchie, T. Fujiwara, A. Kusumi : Quantitative analysis of the hop diffusion of lipid in the cell membrane. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- K. Tanaka, T. Fujiwara, K. Suzuki, Xiao-Yuan Shan, A. Kusumi : Single-molecule observation of the movement of saturated and unsaturated phospholipids on the cell membrane. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- H. Nishimura, K. Ritchie, M. Goto, A. Kusumi : Improvement of single-molecule tracking by the development of new fluorescent silicon nanoparticles. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- H. Nishimura, K. Ritchie, M. Goto, I. Sase, Y. Nakano, A. Kusumi : 新規蛍光ナノ粒子による細胞機能解明への技術開発. H18 年第 1 回 DB 研究開発委員会(2006.9)
- H. Nishimura, K. Ritchie, M. Goto, I. Sase, Y. Nakano, A. Kusumi : Silicon nanoparticles : development of novel fluorescent probes for single-molecule tracking in the live cell membrane, 第 24 回 バイオテクノロジー・シンポジウム (2006.11)
- K. Sakamoto : A function of polar flagellum and anisotropic growth in *Vibrio alginolyticus*, early-phase colonies. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.
- K. Sakamoto, T. Fujiwara, H. Murakoshi, A. Kusumi : Single-molecule tracking of signaling molecules undergoing anomalous diffusion in the plasma membrane. The 373th We-Heraeus-seminar : Anomalous Transport, Bonn (Germany), 2006.7.12-16
- K. Iwasawa : Single fluorescent molecule tracking of MARCKS on the cytoplasmic surface of the cell membrane. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto (Japan) 2006.3.



シミュレーション医工学研究領域 Department of Medical Simulation Engineering

分野主任 教授 堤 定美

Prof. Sadami Tsutsumi

【研究概要】

本研究室では、生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために、コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて、以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として、特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果、等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って、各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され、この制約の下に、生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。(新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金および NITE との共同研究)(厚生労働省科学研究費補助金)

2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は、天然歯根のように歯根膜を持たず、直接顎骨に固定させるので、咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果、歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり、ゆるみが生じる危険性が高い。そこで、チタン製人工歯根をポリマーで被覆し、表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し、さらにその上に歯根膜細胞を培養し、歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。(文部科学省科学研究費補助金)

3. MR Elastography (MRE)による in vivo 弾性率データの計測、解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法(MRE)は、MRI をベースとする新たな測定技術であり、これによる体内組織・器官の非侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感(VR)による VR モデルシステムを開発している。(情報学専攻との共同研究)

4. パラレルメカニズム咀嚼ロボット

歯科や外科領域での診断や手術では、人体構造の静的な位置情報だけでなく、動的な運動情報が予後を左右する。運動情報をコンピュータに取り込むためにパラレルメカニズムを採用した多関節アームを開発してきたが、さらに駆動系を組み込んだパラレルロボットを開発し、個々の患者の口腔内モデルを咀嚼中に計測した顎運動情報に基づいて運動させるシステムを開発した。

5. 歯冠修復用高強度・高靱性ガラスセラミック材料と加圧成型システムの開発

優れた生体適合性と従来の歯科用ポーセレンよりも3~4倍高い曲げ強度と破壊靱性値をもつDiopside系ガラスセラミック材料を開発し、900℃付近で加熱・加圧成型・結晶化するシステムなど加工性と審美性をも備えた新しい歯冠修復用材料を研究してきており、臨床試験の最中である。

6. 新しい生体材料としてのマグネシウム合金の開発

生体必須のミネラルであり、比強度がもっとも高い金属の一つであるマグネシウムは、体液中でアパタイトの沈着が速やかであり、新生骨との結合と転化に優れた特性を有することを見出し、生体材料とくに人工骨用材料としての応用を目指している。(京都府中小企業総合センターとの共同研究)

7. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。(医学研究科整形外科学講座との共同研究)

8. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られている。

9. 生体組織と材料の衝撃吸収特性など力学的物性の測定ならびに解析

衝撃解析シミュレーションや生体を模した頸部モデルによる追突実験から、鞭打ち損傷を解明し、安全で快適な自動車シートの開発を試みている。

10. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノール成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)が細胞・組織の保護作用を持つことを発見し、生体組織の保存に応用する研究を行っている。角膜に関しては、既存の角膜保存液は約1週間の保存期間であったが、EGCGを添加することにより2週間の保存期間でも上皮、内皮ともに形態、機能を維持することができる保存液を開発した(京都府立医科大学眼科教室共同研究)。

末梢神経を約4週間保存し、その後移植することで拒絶無く生着させる事が可能であることを見出した(京都大学医学部整形外科共同研究)。

膵臓は凍結解凍によりダメージを受けインスリン分泌能などが低下するため臨床用には凍結保存法は採用されていない。我々は凍結障害を防止し、形態・機能共に維持したまま保存することが可能であることを示した(京都大学医学部移植外科共同研究)。

EGCGで組織を処理することにより移植後の急性期拒絶を抑える可能性を見出した。マウスリンパ球の表面抗原の解析を行い、EGCGが免疫細胞の抗原認識を一部阻害することが原因であることを突きとめ、リンパ球移植実験で効果を確認した。この技術を用いることにより将来的に免疫抑制剤の投与量を減少させることが期待される。

EGCGで移植用血管を処理することで移植後の内膜肥厚を抑制し狭窄を予防できることを発見した。これにより心臓疾患治療のための冠動脈バイパス手術の成功率を高めることが可能である(京都大学医学部心臓血管外科共同研究)。

11. 骨格筋収縮エネルギーを利用した人工心臓駆動システム(筋肉の力学モデルの構築)

患者自身の筋肉を駆動力に用いる「骨格筋ポンプ」と呼ばれる新しいデバイスの開発を目的としている。広背筋と胸膜の間にバルーンを挟み込み、広背筋に電気刺激を与えて収縮させ、その収縮力を人工心臓の駆動力として有効に利用する。(文部科学省リーディングプロジェクト)

12. 生体形態計測システムと手術シミュレーション(顎変形症治療計画支援システム)

顎変形症手術に際しては、患者と術者とが術式の定量的検討と術後の咬合機能と顔貌の改善予測情報を確認して

(informed consent) , 望むことが極めて重要である。3次元画像を多用した、治療計画支援のためのシステムを開発している。(医学研究科口腔外科学講座および整形外科科学講座との共同研究)

13. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート (PMMA) と、射出成型タイプのポリサルホン (PS) やポリカーボネート (PC) が知られている。加熱重合タイプの PMMA は、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

そのため、これに替わる材料として PS や PC が射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところが PS は耐衝撃性に劣り、また PC についても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらに PMMA 補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、しかも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残存モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供する準備を行っている。(近畿経済産業局速攻型地域新生コンソーシアム研究開発事業)

1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated.

(Joint Research with Information Division, Kyoto University)

4. Kinematic Analysis of a mastication Robot employing the 6-degree-of-freedom parallel mechanism

Dynamic behaviors of the human body affect the diagnosis or the prognosis of operations in dental and surgery fields. In our laboratory, mastication robot is developed in order to represent the human mandibular dynamics ; i.e. not only kinematics but also pressure acting between jaws. The robot employs the 6-degree-of-freedom parallel mechanism

in order to decrease the positional information errors.

5. Development of glass ceramics with high strength and toughness and pressure forming systems for restorative crown materials

Diopside glass ceramics is known as biocompatibility. Moreover, we have been developing the ceramics to have 3 and 4-fold higher the strength and toughness than the used dental porcelains. The crystallization system with heating and pressure molding is developed and now is running a clinical trial.

6. Development of magnesium alloys as biomaterials.

Magnesium offers several advantages such as low density, high specific strength to weight ratio, good castability, non-toxic. Moreover, magnesium is an essential element in human body. The present study is carried out to evaluate magnesium in medical and dental applications and to examine its corrosion behavior. (A joint research with Kyoto Fuchu small enterprise and synthesis centers)

7. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material.

8. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.

The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

9. Measurement and Analysis of Impact Energy Absorption of the Living Tissues and Biomaterials.

By computer simulations and experiments with anatomical cervical model in rear-end collision, the generation mechanism of the whiplash injuries is clarified, and the development of the safe automobile sheet is being tried.

10. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.

EGCG, a green tea polyphenol, not only improves preservation of non-frozen tissues such as cornea, nerves, and pancreatic but solves some potential problems pertaining to transplantation and cardiovascular medicine. EGCG with its immuno-suppressive and anti-proliferative effects prevents graft rejections in various tissues and neo-intimal hyperplasia in vein grafts, respectively. Therefore, the use of EGCG for preserving the living tissues and controlling their cellular responses will provide us a starting point to advance the future of regenerative medicine.

11. Mechanical Analysis of the isometric Contraction of the Skeletal Muscles for an Artificial Heart Support. (Construction of Dynamic Model of the Muscle)

Our development of a new device called “skeletal muscle pump” which uses the Latissimus Dorsi muscle for artificial heart drive system using the skeletal muscle contraction has been investigated. A balloon is inserted between the muscle and pleura, and an electric stimulation is given in the muscle to contract, and the shrinkage force is effectively utilized as driving force of the artificial heart. (Reading Project of The Ministry of Education, Culture, Sports, Science

and Technology, Reading Project)

12. Morphometry System and Operation Simulation (Therapeutic Planning Support System for Jaw Deformities)

In the jaw deformation disease operation, patients and surgeons would like to confirm quantitative evaluation of operative method and improvement of postoperative occlusal function and feature (informed consent). The system for the therapeutic planning support which uses the three-dimensional images abundantly has been developed. (Joint Research with Department of the Oral Surgery and Orthopaedic Surgery Kyoto University)

13. The gentle denture base in human body

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethylmethacrylate (PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate (PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin.

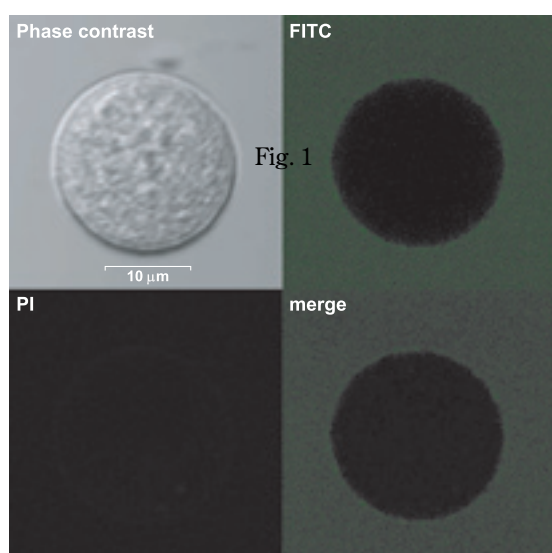


Fig. 1. Phase contrast images of L-929 murine fibroblasts before FITC-EGCg treatment.

EGCg : epigallocatechin-3-O-gallate (a major polyphenolic constituent of green tea)

FITC-EGCg : fluorescein isothiocyanate (a green fluorescent conjugated with EGCg)

PI : propidium iodide (a counterstaining agent for cell nucleus)

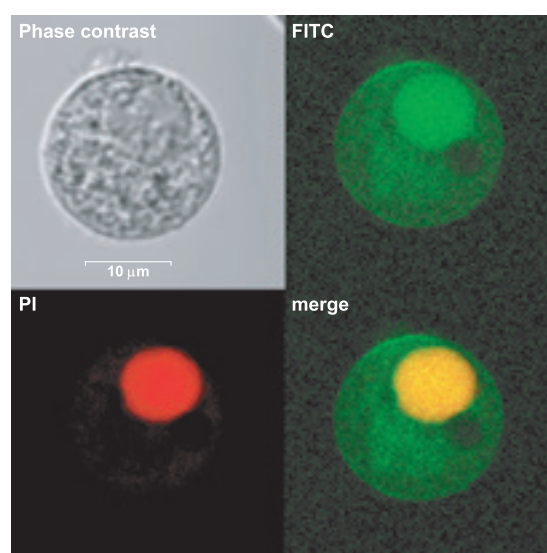


Fig. 2. Confocal laser microscopic images of L-929 murine fibroblasts 4 hrs after 100 μ M FITC-EGCg treatment.

Fluorescent images indicate that FITC-EGCg penetrated into the cytosol and further into the nucleus.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kim, I-D., Azuma, T., Ido, A., Moriuchi, A., Numata, M., Teramukai, S., Okamoto, J., Tsutsumi, S., Tanaka, K.,

- Tsubouchi, H. : Navigator-echo-based MR provides high-resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media, *Liver Transplantation*, 12 : 72-77, 2006.
- Morino S, Toba T, Araki M, Azuma T, Tsutsumi S, Tao H, Nakamura T, Nagayasu T, Tagawa T. Noninvasive assessment of pulmonary emphysema using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Experimental lung research*. 2006 Jan-Feb ; 32(1-2) : 55-67.
- Jung, D-K., Kang, Y-B, Tsutsumi, S., Nakai, R., Ikeuchi, K., Sekel, R. : Computational Evaluation of the Effects of Bone Ingrowth on Bone Resorptive Remodeling after a Cementless Total Hip Arthroplasty, *JSME International Journal, Series C*, 49(1) : 135-143, 2006.
- Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Aoyama, T., Shibata, KR., Otsuka, S., Fukiage, K., Nishijo, K., Ishibe, T., Shima, Y., Otsuki, B., Azuma, T., Tsutsumi, S., Nakayama, T., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J. : Regeneration of Osteonecrosis of Canine Scapho-Lunate using bone Marrow stromal cells : Possible Therapeutic Approach for Kienboeck Disease, *Cell Transplantation, the Regenerative Medical Journal*, 15 : 411-122, 2006.
- Han, D-W., Hyon, S-H., Park, J-C, Park, K-D., Park, Y-H., Park, H-K. : Non-frozen preservation of mammalian tissue using green tea polyphenolic compounds. *Biomedical Materials*. 1 : R18-R29 (2006)
- Han, D-W., Lim, H-R., Baek, H-S., Lee, M-H., Lee, S-J., Hyon, S-H., Park, J-C. : Inhibitory effects of epigallocatechin-3-o-gallate on serum-stimulated rat aortic smooth muscle cells via nuclear factor- κ B down-modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **345** : 148-155 (2006)
- Matsumura, K., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Epigallocatechin-3-O-gallate as a novel preservation additive for tooth transplantation. *J Oral Tissue Engin.* **3(3)** : 125-130 (2006)
- Ohkawa, T., Nakamura, K., Itoman, M., Jin, F., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Evaluated of the γ -ray radiosterilized cross-linked PLLA and PLLA/HA in vivo. *Key Engineering Materials*. **309-311 II** : 1117-1120 (2006)
- Han, D-W., Cho, H-H., Matsumura, K., Park, J-C., Baek, H-S., Lim, H-R., Lee, M-H., Woo, Y-I., Hyon, S-H. : Attenuated proliferation and migration of rat aortic smooth muscle cells into epigallocatechin-3-O-gallate-loaded collagen matrices. *Biomaterials Research*. **10(1)** : 36-42 (2006)
- Park, B-J., Park, J-C., Taguchi, H., Fukushima, K., Hyon, S-H., Takatori, K. : Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **347** : 401-405 (2006)
- Hyon, S-H., Matsumura, K., Kim, J-Y. : The application of green tea polyphenol to regenerative medicine.. *Biomaterials Research*. **10(3)** : 117-124 (2006)
- Sawai, D., Yokoyama, T., Kanamoto, T., Moon, S-I., Hyon, S-H., P, Liuba., Myasnikova. : Crystal transformation and development of tensile properties upon drawing of Poly(L-lactic acid) by solid-state coextrusion : effects of molecular weight. *Macromol. Symp.* **242** : 93-103, (2006)
- 澤井大輔, 玉田真規, 横山隆文, 金元哲夫, 玄 丞然, 文 成日 : 高分子量ポリ L-乳酸/ポリ D-乳酸ブレンド試料の延伸によるステレオコンプレックスの生成と延伸物の力学物性. 繊維学会誌(in press)
- 澤井大輔, 樋口直之, 金元哲夫, 玄 丞然, 優れた高温物性を有するポリ L-乳酸/単層カーボンナノチューブコンポジットの作製. 繊維学会誌(in press)
- Nakajima, N., Sugai, H., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Self-degradable bioadhesive. *Key Engineering Materials*. (in press)

- Han, D-W., Cho, H-H., Jung, D-Y., Lee, J-J., Matsumura, K., Park, J-C., Hyon, S-H. : Rat vascular smooth muscle cell behaviors onto Epigallo- Catechin Gallate-Blended L-Lactide/ ϵ -Caprolactone copolymers. Key Engineering Materials.(in press)
- Cho, H-H., Matsumura, K., Nakajima, N., Han, D-W., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Degradation control of collagen by Epigallo-Catechin-3-O-Gallate. Key Engineering Materials.(in press)
- Hyon, S-H., Kim, D-H., Cui, W., Matsumura, K., Kim, J-K., Tsutsumi, S. : Preservation of rat aortic tissue transplant with green tea polyphenols. Cell Transplantation. **15**, 881-883 (2006)
- 笈田武範, 大野友和, 天野 晃, 姜 有峯, 岡本 淳, 東 高志, 瀧澤 修, 堤 定美, 松田哲也: 弾性波あてはめ法による MR Elastography からの粘弾性定数の導出: 電子情報通信学会論文誌, Vol.J89-D No.10 (2006) pp.2348-2360.
- 隠浪康行, 小林哲生, 鄭 址旭, 大橋俊平, 濱田昌司, 長峯 隆, 福山秀直, 東 高志, 堤 定美. 複数皮質活動の動的イメージングのための fMRI-MEG 統合解析法. 生体医工学 2006; 43 (4) : 777-784.
- Kang, Y.B. , Oida, T., Fukuma, A., Azuma, T., Okamoto, J., Takizawa, O., Matsuda, T., Tsutsumi, S., : NON-INVASIVE MEASUREMENT OF IN VIVO ELASTICITY OF SKELETAL MUSCLES WITH MR-ELASTOGRAPHY : Key Engineering Materials (in press)
- Jung, D.Y., Kang, Y.B., Tsuchiya, T., Tsutsumi, S. : A Novel Non-Destructive Method for Measuring Elastic Moduli of Cultivated Cartilage Tissues : Key Engineering Materials (in press)
- 笈田武範, 藤原卓矢, 天野 晃, 姜 有峯, 岡本 淳, 瀧澤 修, 堤 定美, 松田哲也: MR-Elastography における定常および非定常振動を用いた撮影法の評価: 生体医工学(in press)

2) 著書および総説

- 堤 定美: 弾性 MRI (MRE), 医療機器と再生医療—開発最前線と今後の動向—, 情報機構(東京): pp.43-60, 2005.
- 玄 丞休: 医療用ファイバーとしてのポリ乳酸 工業材料 54 No.5 : 70-75 (2006)
- 玄 丞休: 糖からつくる高性能の医療用接着剤 化学 61 : 74-75 (2006)
- 松村和明, 玄 丞休: 緑茶カテキンの移植医療への応用.「茶の効能と応用開発」(伊勢村護 監修, シーエムシー出版) 283-294 (2006)
- 姜 有峯, 堤 定美: コンピュータシミュレーションを用いた外傷に関する生体力学的研究: 日本外傷学会雑誌 第 20 巻 第 2 号 (2006), pp73-78.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 矢儀一智, 前田芳信, 今石こず恵, 東 高志, 堤 定美, 中村俊英, 柿本直也, 村上秀明: 下顎位の違いが上気道形態に与える影響. 日本歯科補綴学会関西支部 (2006.1.29. 京都)
- 姜 有峯, 堤 定美: 鞭打ち損傷に関する数値シミュレーション: LSD-DYNA ユーザーカンファレンス (2006.4.18. 東京)
- Koizumi, T., Leonard, C.D., Schwemberger, S., Hyon, S-H., Babcock, G.F. : Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates neutrophil apoptosis and the production of reactive oxygen species. 38th Annual Meeting of the

American Burn Association (ABA) (2006.4.4-7. Las Vegas)

井前直人, 小林哲生, 鄭 址旭, 東 高志, 堤 定美: MR-DTIの併用によるfMRI脳活動領域解析の精度向上に関する検討. 第1回複合医工学シンポジウム (2006.5.19-20. 京都)

田中哲平, 小林哲生, 甲本亜矢子, 鄭 址旭, 東 高志, 堤 定美: サッカーに関わる脳活動領域のfMRI計測: 多安定知覚時との比較. 第1回複合医工学シンポジウム (2006.5.19-20. 京都)

折尾大樹, 小林哲生, 鄭 址旭, 井前直人, 東 高志, 堤 定美: 水分子ADC変化とBOLD法に基づく示指伸展運動時の脳活動計測. 第1回複合医工学シンポジウム (2006.5.19-20. 京都)

澤井大輔, 金元哲夫, 玄 丞然, 文 成日: ポリ L-乳酸の固相共押出延伸による結晶転移一分子量効果. 第55回高分子学会年次大会 (2006.5.24-26. 名古屋)

中島直喜, 須賀井一, 玄 丞然: 自己分解性を有する医療用接着剤. 第55回高分子学会年次大会 (2006.5.24-26. 名古屋)

松村和明, 高山博史, 裴 庭胤, 栗原 満, 堤 定美, 玄 丞然: カテキンによる血小板保存効果. 第3回日本カテキン学会総会 (2006.6.3-4. 東京)

玄 丞然, 韓 東旭, 裴 庭胤, 松村和明, 脇谷滋之, 縄田昌司: カテキンによるブタ関節軟骨およびヒト関節軟骨の未凍結保存. 第3回日本カテキン学会総会 (2006.6.3-4. 東京)

金元哲夫, 古川智規, 澤井大輔, 玄 丞然, 文 成日: 結晶型, 配向性及び結晶種分率が異なるポリ L-乳酸の結晶弾性率. 平成18年度繊維学会年次大会 (2006.6.12-14. 東京)

有馬奈美, 澤井大輔, 金元哲夫, 玄 丞然, 文成日: 光学純度の異なるポリ乳酸のエージング条件の違いによる構造と物性の変化. 平成18年度繊維学会年次大会 (2006.6.12-14. 東京)

Kobayashi T, Innami Y, Jung J, Ohashi S, Hamada S, Nagamine T, Fukuyama H, Azuma T, Tsutsumi S: Development of a dynamic neuroimaging technique based on fMRI-MEG integration. 12th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain. (6 2006. Florence, Italy)

曹 漢姫, 韓 龍海, 金 学姫, 松村和明, 堤 定美, 玄 丞然: 抗がん剤(Cis-platin)とサケ由来 DNA の複合体からの薬物伝達システム. 第22回日本 DDS 学会 (2006.7.7-8. 東京)

金 学姫, 中島直喜, 須賀井一, 松村和明, 玄 丞然: 自己分解性医療用接着剤を用いた非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の徐放システム. 第22回日本 DDS 学会 (2006.7.7-8. 東京)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 遠藤克昭, 早川克己, 市原理司, 藤川孝満, 東 高志, 堤 定美, 西尾健資: 脊髄損傷に対する有茎大網被覆治療の有効性. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)

Hyon, S-H: Novel biodegradable hydrogel for DDS. 33rd Annual Meeting of Exposition of the Controlled Release Society (2006.7.22-26. Austria)

Kang, Y. B., Oida, T., Fukuma, A., , Azuma, T, Okamoto, J., Takizawa, O., Matsuda, T., Tsutsumi, S.: "In vivo measurement of anisotropic elasticity of skeletal muscles with MR-Elastography": 5th World Congress of Biomechanics (Munich, July 28 ~ Aug. 4, 2006.)

Urayama U, ugimoto N, Jouo F, Yamamoto T, Azuma T, Tsutsumi S, Fukuyama H. Four-dimensional {MR} tagged imaging and image processing. In International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery, (8 2006. Korea)

Kang, Y. B., Oida, T., Fukuma, A., Azuma, T., Okamoto, J., Takizawa, O., Matsuda, T., Tsutsumi, S.: "NON-INVASIVE MEASUREMENT OF IN VIVO ELASTICITY OF SKELETAL MUSCLES WITH MR-ELASTOGRAPHY": 7th

Asian Symposium on Biomedical Materials (Jeju Island, Korea. Aug. 20-23, 2006)

姜 有峯, 堤 定美: 超高速 MR 撮像法による生体軟組織の形態・機能計測: 日本歯科理工学会近畿・中四国支部平成 18 年度夏季セミナー (2006.8.26. 大阪)

Azizi, M., 藤延幸代, 中村淳一, 児玉 亮, 玄 丞休: The trial Preservation of cultured hepatocytes in radial flow bioreactor for artificial liver assist system.. 第 5 回日本再生医療学会総会 (2006.3.8-9. 岡山)

玄 丞休, 曹 漢姫, 松村和明, 堤 定美: サケ白子 DNA-抗がん剤シスプラチン複合体の調整とマイクロスフェアの抗腫瘍効果. 第 1 回核酸・核タンパク機能性研究会 (2006.8.11. 札幌)

Han, D-W., Park, J-C., Hyon, S-H. : Preservation of neonatal human fibroblast by epigallocatechin gallate and its possible mechanism. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

Park, B-J., Park, J-C., Taguchi, H., Fukushima, k., Hyon, S-H., Takatori, K. : Antifungal activity of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) on candida species for biomedical materials and devices. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

Han, D-W., Cho, H-H., Jung, D-Y., Lee, J-J., Matsumura, K., Park, J-C., Hyon, S-H. : Vascular smooth muscle cell behaviors onto epigallocatechin gallate-blended L-Lactide/ ϵ -caprolactone copolymers. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

Cho, H-H., Han, D-W., Matsumura, K., Hyon, S-H. : Stabilization of collagen by epigallocatechin gallate and its interactions with vascular smooth muscle cells. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

Lee, T-H., Jung, J-H., Kim, J-K., Han, D-W., Hyon, S-H., Park, J-C. : Manufacture of PLGA microparticles for sustained EGCG release. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

Lee, D-H., Kim, N-R., Park, J-C., Hyon, S-H., Yang, H-C. : Effects of EGCG on the differentiation ability of human dental pulp cells in vitro. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (2006.8.20-23. Jeju Island)

アジジ ミスコン, 山岡哲二, 宇山 浩, 児玉 亮, 玄 丞休: Radial flow type bioreactor for bioartificial liver support system and preservation of cultured hepatocytes at room temperature. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

寿 典子, 松村和明, 玄 丞休, 大串 始: 緑茶カテキン (EGCG) によるヒト間葉系幹細胞の保存効果. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

韓 東旭, Bae Jung Yoon, 松村和明, 脇谷滋之, 縄田昌司, 玄 丞休: Cold preservation of human osteochondral tissues in EGCG-Added storage solution. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

金 学嬭, 須賀井一, 松村和明, 川添 剛, 鈴木茂彦, 森本尚樹, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノール EGCG を用いた皮膚組織の長期保存. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)

玄 丞休, 中島直喜, 須賀井一, 堤 定美: 生分解性を有する軟組織接着剤. 第 4 回日本再生歯科学会学術大会および総会 (2006.9.9-10. 大阪)

東 高志, 中井隆介, 金 一徳, 浦山慎一, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Navigator-echo を用いた 3 次元肝容積の計測法の開発. 第 34 回日本磁気共鳴医学会大会 (2006.9.14-16. 茨城)

東 高志, 中井隆介, 浦山慎一, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Diffusion Tensor MRI を利用したヒト軟骨の構造解析. 第 34 回日本磁気共鳴医学会大会 (2006.9.14-16. 茨城)

中井隆介, 東 高志, 福田正順, 中村達雄, 浦山慎一, 岸上義弘, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Diffusion

Tensor MRI を用いたイヌの脊髄損傷モデルにおける脊髄修復過程の画像化. 第 34 回日本磁気共鳴医学会大会 (2006.9.14-16. 茨城)

澤井大輔, 玉田真規, 金元哲夫(京大), 玄 丞休, 文 成日: 高分子量ポリ L-乳酸/ポリ D-乳酸ブレンドからのステレオコンプレックス結晶試料の作製と作製試料の構造と物性. 第 18 回高分子加工技術討論会 (2006.10.23-24. 名古屋)

玄 丞休, 中島直喜, 須賀井一, 堤 定美: 自己分解性を有する 2 液反応型の軟組織接着剤. 第 48 回日本歯科理工学会学術講演会 (2006.10.28-29. 名古屋)

姜 有峯, 猪熊宏幹, 福岡 敦, 丘 進卿, 堤 定美, 菅原 桂, 鄭 徳泳, 土屋利江: 再生軟骨の力学的成熟度評価のための非接触式体積弾性率測定法の開発: 第 33 回日本臨床バイオメカニクス学会 (2006.11.3-4. 新潟)

姜 有峯, 鄭 徳泳, 山本貴士, 丘 進卿, 堤 定美: 数値シミュレーションによる人工股関節の力学的耐久性評価に関する研究: ANSYS Conference 2006 JAPAN (2006.11.15-16. 東京)

柏井茂達, 小林哲生, 鄭 址旭, 甲本亜矢子, 東 高志, 堤 定美: 衝動性眼球運動と滑動性眼球運動に関わる脳活動のfMRIによる計測と検討. 第 21 回生体・生理工学シンポジウム (2006.11. 鹿児島)

折尾大樹, 小林哲生, 鄭 址旭, 井前直人, 東 高志, 堤 定美: 拡散MRIの周波数解析に基づく脳機能イメージングの試み: BOLD法との比較. 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会 (2006.11. 仙台)

井前直人, 小林哲生, 鄭 址旭, 東 高志, 堤 定美: 認知神経医療への応用を目指した拡散テンソルMRIの計測と解析. 第 49 回自動制御連合講演会, OS「医療に貢献する計測・制御・システム技術」(2006.11. 神戸)

姜 有峯, 猪熊宏幹, 福岡 敦, 丘 進卿, 堤 定美, 菅原 桂, 原 実生子, 鄭 徳泳, 土屋利江: 非接触式体積弾性率測定法を用いた培養軟骨の成熟度評価に関する研究: 第 28 回日本バイオマテリアル学会 (2006.11.27-28. 東京)

速水 尚, 松村和明, 玄 丞休, 本津茂樹, 中村孝志, 堤 定美: 人工関節軟骨の細胞接着性に及ぼすアパタイト超薄膜被覆の効果. 第 33 回日本臨床バイオメカニクス学会 (2006.11.3-4. 新潟)

松村和明, 曹 漢姫, 堤 定美, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノールを用いたコラーゲンの架橋に関する研究. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006.11.27-28. 東京)

金 学嬉, 川添 剛, 鈴木茂彦, 松村和明, 堤 定美, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノールを含有したコラーゲンポンジの糖尿病マウス皮膚創傷治癒への応用. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006.11.27-28. 東京)

曹 漢姫, 韓 東旭, 松村和明, 鄭 徳泳, 中島直喜, 堤 定美, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノールを含有した P(LA-co-CL) 上での血管平滑筋細胞の挙動とそのステントへの応用. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006.11.27-28. 東京)

金 学嬉, 川添 剛, 鈴木茂彦, 松村和明, 堤 定美, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノール EGCG を用いた熱傷の治癒効果. 第 36 回日本創傷治癒学会 (2006.12.4-5. 東京)

2) 講演・シンポジウム

玄 丞休: 緑茶ポリフェノールを用いた移植用生体組織の常温長期保存液. 第 5 回国際バイオ EXPO JAPAN 国際バイオフォーラム(依頼講演) (2006.5.17-19. 東京)

玄 丞休, 中島直喜, 須賀井一, 堤 定美: 生分解性を有する二液反応型の医療用接着剤. 平成 18 年度繊維学会年次大会 (依頼講演) (2006.6.12-14. 東京)

玄 丞休：DDSのための生分解性ハイドロゲル. 第22回日本DDS学会(依頼講演)(2006.7.7-8. 東京)

Sadami,T.: Biomechanics simulation of osteoporotic remodeling process. ISFR SYMPOSIUM(招待講演)
(2006.10.9-11. Kyoto)

玄 丞休, 中島直喜, 須賀井一：自己分解性を有する新しい医療用接着剤. 第44回日本人工臓器学会大会(依頼講演)(2006.10.31-11.2. 横浜)

Suong-Hyu Hyon : New medical adhesive with the biodegradability using the food additives. 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (ASBM-7) (招待講演) (2006.8.20-23. Jeju Island)

玄 丞休, 松村和明：生体組織の常温長期保存液の創製. プレベンチャー事業平成15年度採択課題研究開発成果報告会(依頼講演)(2006.11.10. 東京)

玄 丞休：生分解性高分子材料の再生医療への応用. 口腔医科学会第4回学術大会(招待講演)(2006.11.18-19. 東京)

玄 丞休, 中島直喜, 須賀井一：生分解性を有する2液反応型ハイドロゲル. 第28回日本バイオマテリアル学会大会(依頼講演)(2006.11.27-28. 東京)

ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano-Biomechanism

助手 都賀谷紀宏

Assis. Prof. Toshihiro Togaya

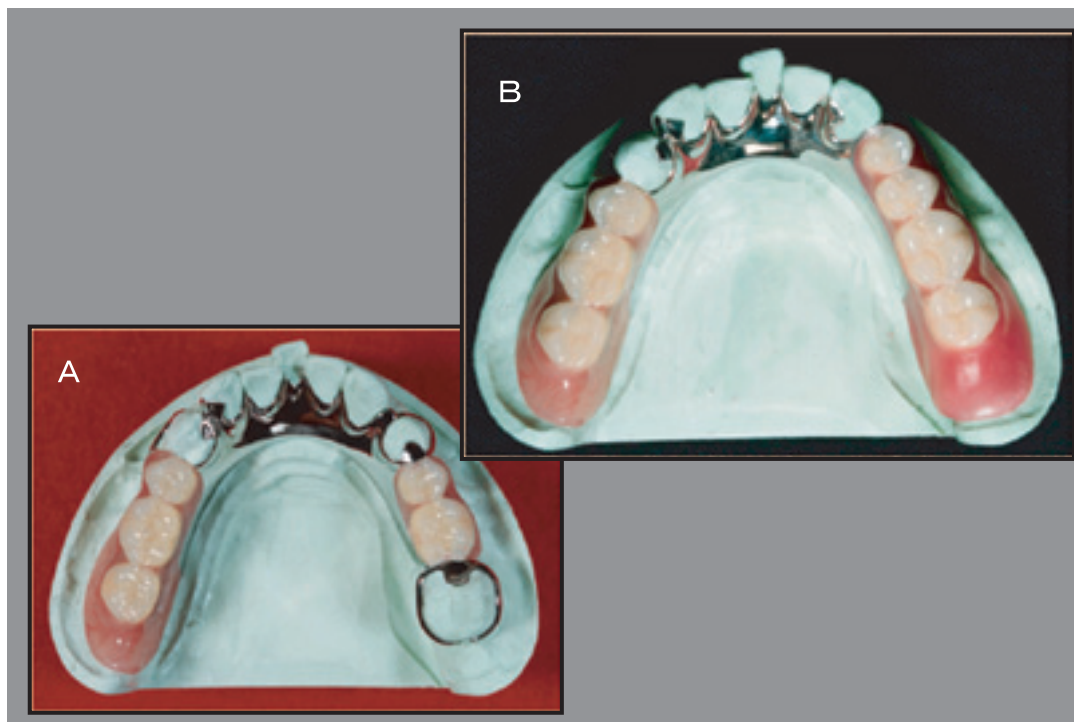
【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況の中、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造(義歯)には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会科学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function (ingestion, mastication, swallowing and phonation) are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足感も高い。
A: リフォーム前 B: リフォーム後

The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are investigating such a sociological problem.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 著書および総説

竹内正敏，都賀谷紀宏共著：口腔内装置作製のためのサーモフォーミング徹底活用(砂書房，東京都)2006

都賀谷紀宏，南里嶺仁，花谷重守，松井義和：新技術を臨床に活かす。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)6-13(2006)

都賀谷紀宏：レーザー溶接の現状と展開。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)14-19(2006)

都賀谷紀宏：エレクトロフォーミング出現の背景。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)112-113(2006)

都賀谷紀宏：CAD/CAM システムの現在。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)118-119(2006)

都賀谷紀宏：レーザー溶接について知っておいてほしいこと。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)140-144(2006)

都賀谷紀宏：レーザー溶接の基礎。「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)144-158(2006)

都賀谷紀宏：レーザー溶接技工の問題点と普及の課題，「補綴設計・リフォーム・修理 レーザー溶接・新技法を臨床に活かす」(都賀谷紀宏編，医歯薬出版，東京都)159-161(2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏：歯科技工のパラダイムシフトー歯科理工学研究者から見た現状打開策ー，平成 18 年度京都歯科医療技術専門学校同窓会学術講演会(特別講演)(2006.12.3. 京都市)

寄附研究部門

組織分化制御学研究部門

Endowed Chairs Department of Morphoregulation

特任助教授 平井 洋平

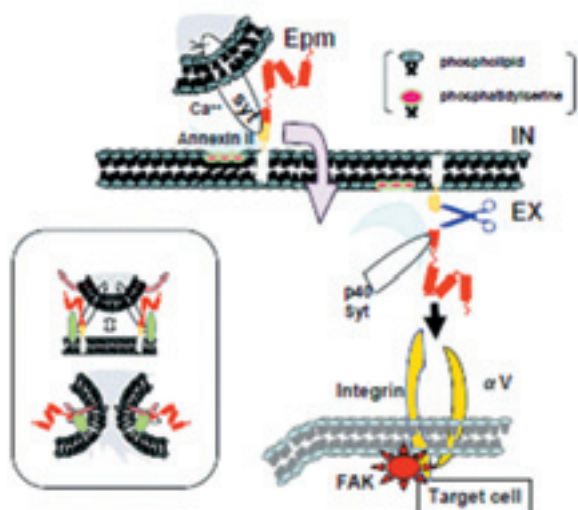
Assoc. Prof. Yohei Hirai

【研究概要】

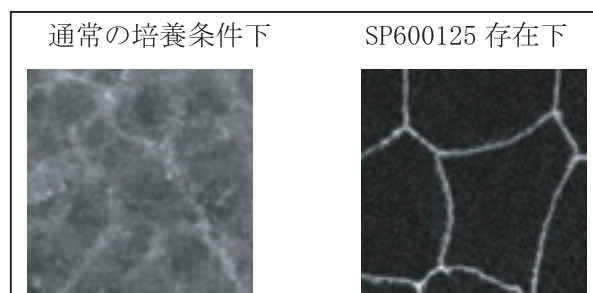
組織を構成する機能細胞(非接着性のものを除いて)が本来の機能を効率的に発揮するためには、細胞同士が互いに規則的に接着・連絡し合いながら高次の構造体を形成していることが必要である。この組織構造物の構築は、発生段階や損傷からの修復過程において特に活発に進行し、この際に実に様々な生理活性物質が時系列的に活躍することが明らかになっている。我々は、組織形成に関わる因子の中で、構築される構造物の形状を決定するエピモルフィンに焦点をあてて、その発現機構と作用機序についての解析研究を行っている。エピモルフィンは必要に応じて細胞外に発現し形態形成を誘導するが、シグナルペプチドを持たないために通常はその多くが細胞膜の内側に留まっている。細胞内では t-SNARE として分泌小胞の膜融合にかかわっていることが示唆されているが、では、どのようにして 1)細胞外に移動し 2)ターゲット細胞に近づき 3)、細胞応答を引き起こすのであろうか。本年度は、同じファミリーに属する蛋白質と共に詳細に分子生物学的に比較・解析することで以下の新知見が得られた。即ち、1)細胞ストレスまたは、カルシウムイオンの流入を契機に、シナプトタグミンの細胞質ドメインやアネキシン II と分泌複合体を形成し phosphatidylserine の膜転移に伴って細胞外に呈示されること、2)細胞外に呈示されたエピモルフィンは速やかに His246 以降が切断されターゲット細胞に向かって分泌されること、3)ターゲット細胞上でインテグリンと結合し FAK を活性化することなどである。つまり、一連のエピモルフィンの細胞外発現機構と作用機序の一部が分子レベルで明らかになったわけである(図1)。今後は、エピモルフィンの形態調節機能の詳細や細胞内外での機能の相関(一つの分子内に全く異なる細胞内外の役割がコードされているのには訳があるはずである)について分子レベルでの研究を深化させると共に、組織レベルでのマクロな機能解析についても検討を加える。マクロな解析を行う際の系としては形態・機能分化が三次元で追跡できる HaCaT を用いた培養表皮モデル等を考えている。

(文責 平井)

第二のテーマとして、皮膚上皮細胞の密着結合の形成過程の解析を行っている。私は、培養皮膚細胞のひとつである HaCaT 細胞が Jun N-terminal Kinase (JNK) 阻害剤である SP600125 存在下で数時間培養されると、密着結合を新規に形成することを発見した(図2参照)。さらに、この新規に密着結合を形成する際にクローディン 4 がリン酸化されることを明らかにした。皮膚組織においてクローディン 4 は密着結合が形成される部位に特異的に局在することから、生体内においてもこの分子がリン酸化されることにより密着結合の形成に積極的に関与していることが期待される。以上の点から、密着結合の形成におけるクローディン 4 のリン酸化の意義を解明することは、非常に興味深いと考えた。そこで次に、クローディン 4 の予想される被リン酸化部位をアラニンに置換した変異分子を作製後、HaCaT 細胞に強制発現させ、SP600125 による密着結合形成にあたえる影響を解析した。すると、いくつか作製した変異分子の中で、195 番目のセリン残基(S195)をアラニンに置換した変異分子が、SP600125 による密



(図1) エピモルフィンの細胞外提示・分泌・機能



(図2) HaCaT 細胞の ZO-1 の局在

着結合形成に対して抑制的に働くことを明らかにした。この結果から、クローディン 4 の S195 のリン酸化が、密着結合の形成に必須である可能性が考えられた。現在、クローディン 4 の S195 をリン酸化するカイネースを探索し、クローディン 4 のリン酸化の意義の解明を目指している。(文責 青野)

Epithelial cells perform their physiological functions by organizing into three-dimensional tissue structures. One of our laboratory focuses is on a protein called epimorphin, the temporal extracellular projection of which has been shown to control the overall structure of tissue architectures. Epimorphin lacks a signal peptide for secretion and the major population remains in the cytoplasmic surface of the membrane, where it functions as a membrane fusion mediator t-SNARE protein. Then, how this molecule translocates across the membrane and gets accessible to the target cells to elicit their morphogenic responses? By the detailed analyses of epitope-tagged epimorphin and its related family members, we found this year that 1) cellular damage or calcium influx leads to extracellular projection of a secretory complex containing epimorphin, annexin II and extravesicular domain of synaptotagmin, 2) extracellularly presented epimorphin is specifically cleaved between E245 and H246 in the SNARE domain and released toward the target cells, and 3) secreted epimorphin is captured by integrin cell surface receptors to activate focal adhesion kinase in the target cells. These results suggest a new model for consequence of epimorphin's extracellular action (Fig. 1). We are now trying to establish the functional relationship between epimorphin's intracellular membrane fusion function and extracellular morphoregulatory function (that apparently distinct roles are encoded in a single molecule should have a biological significance). Also, we will analyze the effect of extracellularly presented epimorphin on the multicellular arrangement and functional differentiation of keratinocyte in 3-D cultures using HaCaT model. (by Hirai, Y.)

Another research project currently working on is the analysis of regulatory mechanisms of tight junction (TJ) formation in keratinocyte. Recently, we found that the localization of ZO-1, one of the components of TJ, changes dramatically in HaCaT, human epidermal keratinocyte cell line, when this cell line is cultured with JNK inhibitor. Moreover claudin-4, another components of TJ, was newly phosphorylated during this process. To understand the biological significance of this claudin-4 phosphorylation, mutant claudin-4 proteins in which putative phosphorylated amino acid was

substituted to alanine were introduced into HaCaT and examined the effects on TJ formation. Then, one of mutant claudin-4 molecule S195A in which 195th serine is substituted to alanine, showed dominant-negative effect on TJ formation. These results strongly suggest that TJ formation of HaCaT is regulated by the phosphorylation of claudin-4. Now, we are looking for the kinase which phosphorylates 195th serine of claudin-4 in HaCaT. (by Aono, S.)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Otani, T., Ichii, T., Aono, S., Takeichi, M. Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *J. Cell Biol.* **175** : 135-46 (2006)
- Iizuka, M., Sasaki, K., Hirai, Y., Shindo, K., Konno, S., Itou, H., Ohshima, S., Horie, Y., Watanabe S. Morphogenic protein epimorphin protects intestinal epithelial cells from oxidative stress by the activation of EGF receptor and MEK/ERK, PI3 kinase/Akt signals. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* [Epub ahead of print] (2006).
- Yoshino, R., Miura, K., Segawa, D., Hirai, Y., Goto, T., Ohshima, S., Mikami, K. I., Yoneyama, K., Shibuya, T., Watanabe, D., Kataoka, E., Takeuchi, S., Endoh, A., Sato, W., Watanabe, S. Epimorphin expression and stellate cell status in mouse liver injury. *Hepatol Res.* **34** : 238-249 (2006)
- Tulachan, S.S., Doi, R., Hirai, Y., Kawaguchi, Y., Koizumi, M., Hembree, M., Tei, E., Crowley, A., Yew, H., McFall, C., Prasad, K., Preuett, B., Imamura, M., Gittes, G. K. Mesenchymal epimorphin is important for pancreatic duct morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* **48** : 65-72 (2006)
- Oka, Y., Sato, Y., Tsuda, H., Hanaoka, K., Hirai, Y., Takahashi, Y. Epimorphin acts extracellularly to promote cell-sorting and aggregation during the condensation of vertebral cartilage. *Dev. Biol.* **291** : 25-37 (2006)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会発表

- Aono, S., Hirai, Y. Kinase-activity-dependent tight junction formation in epidermal keratinocyte cell line. 20th IUBMB Congress (2006.6.21. Kyoto)
- Iizuka, M., Sasaki, K., Hirai, Y., Shindo, K., Konno, S., Itou, H., Ohshima, S., Horie, Y., Watanabe, S. Epimorphin rescues intestinal epithelium from oxidative stress by the activation of EGF receptor- ERK, AKT signals. Annual Meeting of American Gastroenterological Association (2006.5.20. LA)
- Dohmen, T., Ohshima, S., Horie, Y., Kataoka, E., Sato, W., Goto, T., Miura, K., Yoneyama, K., Sato, M., Shibuya, T., Watanabe, D., Segawa, D., Endoh, A., Takeuchi, S., Yoshino, R., Hirai, Y., Iizuka, M., Watanabe, S. Cell protective function of epimorphin against oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Annual Meeting of American Gastroenterological Association (2006.5.20. LA)
- 武田裕嗣, 平井洋平 成長期毛包で発現増加する MAPK シグナル調節因子 Shc-2 の解析 第 14 回 毛髪科学研究会 (2006.12.2. 東京)
- 平井京子, 平井洋平 トリコヒアリン類似蛋白質 AHF の発現挙動 第 14 回 毛髪科学研究会 (2006.12.2. 東京)

2) 講演・シンポジウム

NTS セミナー 平井洋平 再生医療からみた発毛剤の開発 (2006.2.21. 東京)

京大再生研・熊本発生研・理研ジョイントフォーラム (2006.1.31. 熊本)

平井洋平 組織形態誘導分子の新しい呈示・分泌・作用機構

京大再生研・熊本発生研・理研 Joint Forum ポスター (2006.10.10. 京都)

青野真也 平井洋平 Kinase-activity-dependent tight junction formation in epidermal keratinocyte cell line

技 術 部

Division of Technical Support

【研究支援概要】

再生医科学研究所における研究支援の一環として、病理組織標本作製を行っている。2006年1月より12月末までに10分野291件と着実に利用されてきた。

再生実験という特殊な組織標本作製、染色にも独自の工夫を重ね、特に今年はゼブラフィッシュの組織標本作製にも取り組むなど各々の研究者の方の要望に応じてきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製(川本法も含む)、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色

一方、自己研鑽として3月15日京都大学総合技術部第4専門研修、6月2日実験病理組織研究会第13回総会・学術集会、8月2日第31回組織細胞化学会講習、11月21～22日第31回京都大学技術職員総合研修に参加し技術をふかめた。7月27～28日には第21回老化促進モデルマウス(SAM)研究発表会において共同研究者としてその成果が発表された。

また標本作製業務とあわせて、衛生管理者として、週1回の巡視、劇毒物管理等々、研究所の安全衛生に関する業務もおこなっている。

【業 績 目 録】

◆ 誌上発表 ◆

Korenaga T., Fu X, Mori M., Sawashita J., Naiki H., Matsushita T., Higuchi K. : Transmission of Mouse AApoAII Amyloidosis from Mother to Pups. In Amyloid and Amyloidosis. (Eds. Grateau G., Kyle RA., Skinner M.) : 460-462, CRC Press (2005)

◆ 学会、研究発表 ◆

菊森幹人, 古川茂典, 木村伊佐美, 池田博信, 西村孝義, 西森司雄, 小岸久美子, 松下隆壽, 島田厚良, 竹田俊男 : SAMP10 マウスにみる加齢に伴い発症し増悪する胃腸管炎症性病変—予備的研究— 第21回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 (2006.7.27～28)

4. ナノメディシン融合教育ユニット

Nano-Medicine Merger Education Unit

ナノメディシン融合教育ユニットは、ナノテクノロジーとライフサイエンス、並びに医学が融合して初めて実現できる「ナノメディシン」という新しい先端医工学領域において、将来、産学官で活躍できる人材を育成することを目的として開設された教育組織です。

このユニットは京都大学の部局を横断した組織として位置づけられ、医学研究科、工学研究科及び再生医科学研究所が互いに連携しながら運営されます。教育においては既存の研究科・専攻という教育体系の枠組みを越えて、京都大学の豊富な教員スタッフと新たに採用された特任教員とが融合教育ユニットを形成してプログラムをコーディネートし、基礎知識、基礎技術の実習教育、研究指導に当たります。

既に産官で研究者、技術者として活躍されている社会人にナノメディシンに関する基礎知識を講義により提供するとともに、基礎実習及び演習などの実技による再教育を行います。これにより、新領域において問題解決能力をもつ人材へと育成します。

また、再生医科学研究所から神戸バイオテクノロジー研究・人材育成センターに機材の提供・スタッフの派遣を行います。ハードソフトの両面からのサポートを行うことにより、本ユニットの活動を通じて、神戸医療産業都市構想の推進に寄与するものでもあります。

We are proud of foundation of Nano-Medicine Merger Education Unit, which is an educational organization with the aim of nurturing talented experts who can drive translational research, display issue-solving ability, and create next-generation industry in terms of “nano-medicine” generated only by merger of nano-technology, life science, and medicine.

The unit is crossing over Graduate School of Medicine, Graduate School of Engineering, and Institute for Frontier Medical Sciences to make abundant human resources of Kyoto University and new designated researchers grow together, as the result of which we can provide coordinated and fundamental education programs efficiently.

It is an ultimate goal of this unit to contribute to nurturing talent with issue-solving ability in new fields by providing practice and basic lecture about nano-medicine for experts in engineering and research in a specific field.

The essential role of Institute for Frontier Medical Sciences concerned with the activity of this unit in Kobe Biotechnology Research and Human Resource Development Center is providing machinery, materials and staff, which means comprehensive support of hard- and software. It is a pleasure that we can contribute to the promotion of Kobe Medical Industry Development Project through the activity of this unit.

5. 学術集会

5-1 (1) Joint Forum

—IFMS(京大再生研), IMEG(熊大発生研), CDB(理研発生・再生研)—

(2006.10.10 芝蘭会館稲盛ホール)

開会挨拶

IFMS 副所長

岩田 博夫

第1部

「カドヘリン依存性細胞間接着と上皮極性形成」

IMEG 胚形成部門初期発生分野 教授

永渕 昭良

「ES細胞の自己複製と分化を制御する分子機構」

CDB 多能性幹細胞研究チーム チームリーダー

丹羽 仁史

「内皮細胞の運動と形態を制御するシグナル」

IMEG 器官形成部門 造血発生分野 教授

小川峰太郎

「組織間相互作用を仲介する機能性マトリックス」

IFMS 生体組織工学研究部門 生体分子設計学分野 教授 開 祐司

第2部

「細胞形態形成の Fidelity コントロール」

CDB 形態形成シグナル研究グループグループディレクター 林 茂生

「細胞内シグナル伝達経路のクロストークによる神経幹細胞制御機構」

IMEG 胚形成部門 転写制御分野 教授

田賀 哲也

「細胞極性に基ついた増殖と分化の制御」

CDB 非対称細胞分裂研究グループ グループディレクター 松崎 文雄

ポスターセッション

Joint Forum ポスター演題一覧(演題番号順)

演題番号	発表者	所属	演題
1	北村 朗	IFMS 生体機能学研究部門 細胞機能調節学分野	細胞質シャペロニン CCT はポリグルタミンタンパク質の凝集状態を変化させて神経細胞死を抑制する
2	富永 純司	IMEG 胚形成部門 初期発生分野	β カテニンにおける新規リン酸チロシン残基の同定
3	泉 治紀	CDB 幹細胞研究グループ	マウス ES 細胞から中内胚葉細胞への分化における遺伝子ネットワークの解析
4	庄司 昌伸 (Masanobu Shoji, Shinichiro Chuma, Katsuya Okawa, Kouichi Kitamura, and Norio Nakatsuji)	IFMS 再生統御学研究部門 発生分化研究分野	Tudor domain containing 9 (TDRD9), a novel member of the DExH-box protein family, is an RNA helicase specifically expressed in germ cells
5	小林 千余子	IMEG 胚形成部門 細胞識別分野	マウスジグフィンガー遺伝子 Sall4 は内部細胞塊と ES 細胞の増殖に必要である
6	江川 形平	CDB 幹細胞研究グループ	色素幹細胞の発現遺伝子解析
7	高橋 和利, 一阪 朋子, 中川 誠人, 山中 伸弥	IFMS 再生統御学研究部門 再生誘導研究分野	Generation of Pluripotent Stem Cells from Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors
8	田中 聡	IMEG 胚形成部門 細胞識別分野	マウス生殖細胞の特性を担う分子機構の解明
9	佐藤 渉	CDB ボディプラン研究グループ	Sfrp による Wnt シグナル経路の調節が体節形成に果たす役割
10	小松 絃司, 若月 修二, 山田 秀一, 宮崎 純一, 瀬原 淳子	IFMS 再生統御学研究部門 再生増殖制御学分野	心臓形成には神経堤細胞におけるメルトリン β の発現が必要である
11	山口 泰華	IMEG 胚形成部門 細胞識別分野	減数分裂期生殖細胞分化における Importin13 遺伝子の役割
12	山本 佳宏, 泉 裕士, 松崎 文雄	CDB 非対称細胞分裂研究グループ	ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂において運命決定因子の局在を制御する新規因子の解析

演題 番号	発 表 者	所 属	演 題
13	横関 智一, 若月 修二, 初沢 清隆, Roy Black, 和田 郁夫, 瀬原 淳子	IFMS 再生統御学研究部門 再生増殖制御学分野	Ectodomain Shedding を生細胞で見る
14	星居 孝之	IMEG 器官形成部門 臓器形成分野	LGR4 Regulates the Postnatal Development and Integrity of Male Reproductive Tracts in Mice
15	柿原 研	CDB 形態形成シグナル研究 グループ	A Drosophila Arf-like protein regulates luminal membrane assembly to promote tracheal tubule connection
16	角 昭一郎, 漆 智, 柳井 伍一, Shakibur Rahman, 日裏 彰人	IFMS 再生医学応用研究部門 器官形成応用分野	バイオ人工臓の開発
17	辰巳 徳史	IMEG 器 官 形 成 部 門 パ ターン形成分野	ニワトリ肝臓発生における形態形成に関連した分子の解析
18	川橋 幸史	CDB 形態形成シグナル研究 グループ	Modulation of Notch signal transduction by endocytotic regulators Numb and the Nedd4 family of ubiquitin ligases
19	近藤 玄	IFMS 附属再生実験動物施設	受精におけるアンギオテンシン変換酵素の役割
20	白木 伸明	IMEG 再建医学 幹細胞制 御分野	ES 細胞から Pdx1 陽性胚性内胚葉への正常発生に沿った分化誘導
21	下里 大輔, 志岐 真, 丹羽 仁史	CDB 多能性幹細胞研究チー ム	原始内胚葉分化における Gata 因子の役割
22	恒吉 法尋, 安田 晋也, 角 智行, 長谷川光一, 多田 高, 中辻 憲夫, 末盛 博文	IFMS 附属幹細胞医学研究セ ンター 霊長類胚性幹細胞領 域	NANOG is an essential factor for undifferentiated proliferation of monkey ES cells
23	勝本 恵一	IMEG 再建医学 幹細胞制 御分野	ニワトリ胚を用いた, 初期臓腑携帯形成過程の解析
24	中武 悠樹 ¹ , 赤木 紀之 ² , 小出 寛 ² , 横田 崇 ² , 丹羽 仁史 ¹	1)CDB 多能性幹細胞研究 チーム, 2)金沢大学大学院・ 医学系研究科・再生分子医学 研究分野	未分化 ES 細胞において Oct3/4 遺伝子が一定量の発現に収斂する仕組み
25	安達 啓子, 川瀬栄八郎, 安近健太郎, 角 智行, 中辻 憲夫, 末盛 博文	IFMS 附属幹細胞医学研究セ ンター 霊長類胚性幹細胞領 域	Establishment of the Tet-Off gene-inducible system in monkey embryonic stem cell lines
26	石原 宏	IMEG 再建医学 器官制御 分野	クロマチンモデリング因子による CTCF 依存症依存症イ ンスレータ形成機構
27	黒田 貴雄, 木村 博信, 多田 政子, 中辻 憲夫, 多田 高	IFMS 附属幹細胞医学研究セ ンター 幹細胞加工領域	未分化性維持因子 Nanog の細胞周期依存的リン酸化
28	内村 康寛	IMEG 再建医学 器官制御 分野	MBD1 によるヘテロクロマチン形成における SUMO 修飾 の役割
29	青野 真也, 平井 洋平	IFMS 組織分化制御学研究部 門	Kinase-activity-dependent tight junction formation in epidermal keratinocyte cell line

5－1(2) 京都大学再生医科学研究所平成18年度学術講演会

(2006.10.11 芝蘭会館稲盛ホール)

開会挨拶 中辻 憲夫(京都大学再生医科学研究所 所長)

第1部

「ヒト ES 細胞研究の現状と展望」

附属幹細胞医学研究センター
霊長類胚性幹細胞研究領域 助教授

末盛 博文

「細胞融合による体細胞再プログラム化と染色体除去」

附属幹細胞医学研究センター
幹細胞加工研究領域 助教授

多田 高

「MSM/Ms マウスとノックアウトプロジェクト」

熊本大学 発生医学研究センター
器官形成部門 臓器形成分野 教授

山村 研一

第2部

「造血幹細胞ニッチ(niche)とケモカイン CXCL12」

生体機能学研究部門
生体システム制御学分野 教授

長澤 丘司

「制御性 T 細胞による免疫応答制御」

生体機能学研究部門
生体機能調節学分野 教授

坂口 志文

「組織工学からみた生体組織の再生誘導治療」

生体組織工学研究部門
生体材料学分野 教授

田畑 泰彦

第3部

「間葉系幹細胞の生物学と臨床応用」

再生医学応用研究部門
組織再生応用分野 教授

戸口田 淳也

「試験管内分化系を用いた脳発生研究」

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
細胞分化・器官発生研究グループ グループディレクター 笹井 芳樹

閉会挨拶 堤 定美(附属ナノ再生医工学研究センター長 シミュレーション医工学研究領域 教授)

5-2 セミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2006. 1.25	小椋 利彦 東北大学加齢医学研究所	組織形成において生じる細胞のゆがみ はどう受容されるかー細胞骨格から核 へのシグナル伝達, 機械的ストレスか ら遺伝子発現へー	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006. 2.14	Chiara Zurzolo Unite postulante, Trafic mem- branaire et pathogenese, Insti- tut Pasteur	Role of lipid microdomains in GPI-an- chored- protein sorting and prion fold- ing	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域
2006. 2.16	永井 健治 北海道大学電子科学研究所	蛍光・発光タンパク質を利用した生理 機能の可視化と操作	第 130 回細胞生物学 ジョイントセミナー ＝ライブイメージン グの Cutting Edge＝	細胞機能調節学分 野
2006. 2.16	河野 憲二 奈良先端科学技術大学院大学	小胞体ストレス感知機構と UPR の in vivo での可視化	第 130 回細胞生物学 ジョイントセミナー ＝ライブイメージン グの Cutting Edge＝	細胞機能調節学分 野
2006. 2.16	中野 明彦 東京大学大学院理学研究科, 理化学研究所	ゴルジ体の槽間輸送の大論争? ライブ イメージングで解決したか?	第 130 回細胞生物学 ジョイントセミナー ＝ライブイメージン グの Cutting Edge＝	細胞機能調節学分 野
2006. 2.17	渥美 忠男 理化学研究所 中央研究所	ES 細胞からの造血幹細胞株の樹立	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006. 3. 2	Aaron Ciechanover Technion-Israel Institute of Technology, Israel (Laureate of The Nobel Prize in Chemis- try 2004)	Ubiquitin-Mediated Proteolysis of Cel- lular Proteins: From a Vague Idea, Through Basic Mechanisms and onto Human Diseases and Drug Targeting	第 131 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分 野
2006. 3.13	Roger Goody Department of Physical Bio- chemistry, Max-Planck-Insti- tute for Molecular Physiology, Dortmund Chemistry at the University of Dortmund	Combining chemistry and molecular bi- ology to produce tools for biophysics and cell biology	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域
2006. 3.14	伊藤 英晃 秋田大学工学資源学部	哺乳類分子シャペロンの構造と生化学 的性質	第 132 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分 野
2006. 3.28	Keith Willison Institute of Cancer Research, London, UK	Chaperonin CCT mediated folding of actin, energetic landscapes and cell cy- cle control	第 133 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分 野
2006. 3.31	Damien Hall HFSP long-term research fel- low, Chemistry Department, University of Cambridge	Physical Biochemistry Based Studies of Protein Folding and Aggregation	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域
2006. 4.12	Reinhard Köster Institute of Developmental Genetics GSF-National Re- search Center for Environ- ment and Health	Analyzing neuronal migration in vivo : Cellular Behavior and Molecular Mechanisms	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006. 4.14	Paavo Kinnunen Memphys - Center for Biomembrane Physics, Hel- sinki Biophysics & Biomem- brane Group, Department of Medical Chemistry, Institute of Biomedicine, University of Helsinki, Finland	Lipid-triggered formation of amyloid- type fibers : for good & bad	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2006. 5.15	Philippe Devaux University of Paris 7 and Institut de biologie physico-chimique Paris	Many different proteins involved in lipid flip-flop	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006.5.23	Philippe Devaux University of Paris 7 and Institut de biologie physico-chimique Paris	Transmembrane diffusion of unlabeled lipid molecules measured by shape change of giant lipid vesicles	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 6.12	柊 卓志 Department of Developmental Biology, Max-Planck Institute of Immunobiology	Autonomously emerging asymmetry in early mammalian development	第7回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2006. 6.20	Barbara Baird Chemistry & Chemical Biology, Baker Laboratory, Cornell University Nanobiotechnology Center, Cornell University	Zooming in on receptor-mediated cell signaling: the IgE receptor story	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 6.20	Daniel Choquet CNRS-Universite de Bordeaux 2, Physiologie Cellulaire de la Synapse	Single molecule tracking of AMPA and NMDA receptors in synapses	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 6.20	Derek Toomre Department of Cell Biology, Ludwig Institute for Cancer Research, Yale University School of Medicine	Dynamics of clathrin endocytic machinery at the single vesicle and molecule level	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 6.21	Carl P.Blobel Weill Medical College of Cornell University	ADAMs: Key molecules in EGFR-signaling and prostate cancer	細胞外環境セミナー	再生増殖制御学分野
2006. 9. 2	Justin Molloy Head of Division of Physical Biochemistry / MRC National Institute for Medical Research	Single molecules, diffusing and walking on membranes	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 9. 3	Roger Morris Molecular Neurobiology, Head, Department of Biochemistry, Wolfson Centre for Age-Related Diseases, Guy's Campus, King's College London	The trafficking of cellular and infectious prion protein on neurons: what keeps them apart, and what brings them together?	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 9. 6	林 峰輝 国立台湾大学 医学院 医学工学研究所	The Application of GdH Nanoparticle on Stem Cell Tracking	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2006. 9. 6	張 富雄 国立台湾大学 医学院 生物化学・分子生物学研究所	Lipid-based Nanoparticles for Gene Delivery and Imaging	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2006. 9. 8	Joshua Zimmerberg National Institutes of Health, NICHD DIR LCM	The biophysics of membrane fusion and membrane microdomains	ナノバイオプロセス研究領域セミナー	ナノバイオプロセス研究領域
2006. 9.11	Sheng Ding Departments of Chemistry and Cell Biology, The Scripps Research Institute	Chemical and Functional Genomic Approaches Toward Regenerative Medicine	第8回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2006. 9.14	Athanassios Sambanis Georgia Institute of Technology	Towards Developing Secretory Tissues: Biological and Engineering Challenges and Opportunities	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2006. 9.19	鄭 雄一 東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター	細胞センサーによる骨軟骨分化誘導因子のスクリーニングと候補因子の解析	生体分子設計学分野セミナー	生体分子設計学分野

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2006. 9.20	Horst Vogel Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Institut de Sci- ence Biomoleculaire	Cellular signaling at the nanometer and attoliter scale	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域
2006. 9.22	東山 繁樹 愛媛大学大学院医学系 独立行政法人・科学技術振興 機構さきがけ(情報と細胞機 能)	膜型細胞増殖因子による細胞増殖と増 殖抑制解除の共役分子反応	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006. 9.27	G.V.Shivashankar National Centre for Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research	Understanding nanoscale chromatin or- ganization and function within living cells	ナノバイオプロセス 研究領域セミナー	ナノバイオプロセ ス研究領域
2006.10.20	塙 隆夫 東京医科歯科大学生体材料工 学研究所	金属バイオマテリアルの生体機能化	組織修復セミナー	組織修復材料学分 野
2006.10.24	黒岩 常祥 立教大学理学部生命理学科	真核細胞誕生における核の戦略をよむ ー“シゾン”の100% ゲノム解読を基盤 にー	第134回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分 野
2006.10.26	Austin Smith Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research	Nanog and ERas-what are they really for?	第9回再生誘導セミ ナー	再生誘導研究分野
2006.11. 7	Roberto Sitia Universita Vita-salute San Raffaele	Plasma Cell Biogenesis and Death: the Making, Functioning and Disman- tling of an Efficient Antibody Factory	ウィルス研究所・再 生医科学研究所・理 学研究科合同セミ ナー	細胞機能調節学分 野
2006.11.24	見学 美根子 理化学研究所脳科学総合セン ター	小脳皮質形成における顆粒細胞移動ダイ ナミクス	再生増殖制御学セミ ナー	再生増殖制御学分 野
2006.11.27	池川 志郎 独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター	ゲノム時代の疾患研究ーベッドサイド のエビデンスを出発点とした“com- mon disease”, 生活習慣病の解明ー	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006.12.15	小守 壽文 長崎大学大学院医歯薬学総合 研究科	転写因子による骨形成制御機構	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野
2006.12.20	Yasuyoshi Ueki Department of Developmental Biology, Harvard School of Dental Medicine	Molecular and Cellular Pathogenesis of Cherubism ~Insights from rare dis- ease~	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分 野

5－3 研究発表会

若手研究者発表会(2006.3.15)

発表者	所属	演題名
梅 村 康 浩	ナノバイオプロセス	ラフト親和性分子のホップ拡散 ―1分子追跡法による研究―
西 村 博 仁	ナノバイオプロセス	蛍光性シリコンナノ粒子の開発：一分子追跡法への応用
久 保 田 進	細胞機能調節学分野	細胞質シャペロン CCT のシャペロン機能と基質認識機構
法 邑 賢 一	生体微細構造学分野	ツールとしての RNA-RNA アプタマーの選別及びそれを用いた転写機構の解析
坪 岡 則 子	再生誘導研究分野	Functional analysis of Zn finger protein Sall4 highly expressed in undifferentiated ES cells
大 塚 聖 視	組織再生応用分野	イヌキーンバック病に対する間葉系幹細胞移植
佐 藤 秀 樹	組織修復材料学分野	不死化間葉系幹細胞を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養
蟹江(平岡)美奈	幹細胞分化制御研究領域	テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞を用いた細胞分化における in vitro 遺伝子機能解析システムの構築
安 田 晋 也	霊長類胚性幹細胞研究領域	霊長類 ES 細胞における Nanog の役割
姜 有 峯	シュミレーション医学研究領域	鞭打ち損傷に関する数値シミュレーション
木 村 祐	生体材料学分野	生理活性物質の徐放化と足場技術を利用した生体組織の再生誘導
荒 木 政 人	臓器再建応用分野	生体吸収材料を用いた消化管・肺疾患への臨床アプローチ
漆 智	器官形成応用分野	虚血性皮弁の血流と生着率改善に関する研究
☆小 田 裕香子	細胞機能調節学分野	哺乳動物細胞の小胞体関連分解における逆輸送機構
細 川 美穂子	発生分化研究分野	Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: domain composition, intracellular localization and function during spermatogenesis in mice
山 本 祥 也	組織分化制御学研究部門	毛包組織におけるラミン A/C の役割
三 浦 重 徳	生体分子設計学分野	母体－胎仔境界における組織改変とコンドロモジュリン-I の機能
有 馬 祐 介	組織修復材料学分野	種々の表面特性を有する生体材料モデル表面へのタンパク吸着および細胞接着
佐 藤 寿 彦	臓器再建応用分野	人工気管の臨床応用にむけて
古 賀 ま り	器官形成応用分野	脾島細胞と骨髄細胞の電氣的融合細胞の脾島移植への利用の可能性
DONG-WOOK HAN	シュミレーション医学研究領域	Preservation of Human Fibroblasts by EGCG and it Possible Mechanism
平 井 京 子	組織分化制御学研究部門	毛包成長期特異的に発現する AHF タンパク質の機能解析
高 嶋 一 登	ナノバイオメカニズム研究領域	血管内カテーテルシミュレータの開発
城 潤 一 郎	生体材料学分野	遺伝子発現の増強および発現期間の延長を可能にする DDS 技術の開発
☆今 村 公 紀	再生誘導研究分野	DNA hypermethylation of the Octamer/Sox elements in the male germ line of mice
嶋 靖 子	組織再生応用分野	間葉系幹細胞の癌化機構の解析と癌化監視システムの構築
安 達 啓 子	霊長類胚性幹細胞研究領域	霊長類 ES 細胞株における遺伝子発現制御系の構築
☆奨励賞受賞者		

5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会

医工学フォーラムー2005 年度特別学術講演会ー

日時：2006 年 2 月 22 日(水)

場所：京大会館 1 階 101 号室

開会の挨拶

医工学フォーラム会長 筏 義人

1. 細胞の遺伝子マニピュレーションのための医工学技術
2. 自己組織化単分子膜のバイオマテリアル研究
さらに細胞アレイへの展開
3. 海洋性資源の再生医療への応用
4. 磁場を利用した生体物性のナノ計測
5. 関節軟骨の水和潤滑
6. 1 分子追跡によって細胞膜のはたらきを解く
7. in situ Tissue Engineering の臨床応用
8. 糖尿病に対する再生医療の現況
9. 組織幹細胞と癌幹細胞：再生医療の安全性に関連して
10. 長石賞授賞式 授賞講演

田畑 泰彦(生体材料学分野)

岩田 博夫(組織修復材料学分野)

田中 順三

((独)物質・材料研究機構生体材料研究センター)

堤 定美 (ナノ再生医工学研究センターシミュレーション医工学研究領域)

池内 健(ナノ再生医工学研究センターナノバイオメカニズム研究領域)

楠見 明弘(ナノバイオプロセス研究領域)

中村 達雄(臓器再建応用分野)

角 昭一郎(器官形成応用分野)

戸口田 淳也(組織再生応用分野)

特別講演

薬物受容体研究とその創薬への応用

栗山 欣彌(明治鍼灸大学 学長,
京都府立医科大学 前学長)

京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター 主催 「第 1 回ヒト ES 細胞研究交流会」

平成 18 年 3 月 27 日(月) 13:00~18:00

京都大学医学部構内 芝蘭会館稲盛ホール

1. ヒト ES 細胞の培養維持と凍結保存技術等の最新状況
2. ヒト ES 細胞使用研究の体験談と研究内容の紹介
3. ヒト ES 細胞指針の運用と文部科学省の申請手続きに関する動向の紹介

末盛 博文(京都大学再生医科学研究所)

曾根 正勝(京都大学大学院医学研究科)

岡田 洋平(慶應義塾大学医学部)

石井 康彦(文部科学省生命倫理・安全対策室)

6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

◆ 京都大学再生医科学研究所協議員(所外) ◆

塩田 浩平(京都大学大学院医学研究科教授)
 中畑 龍俊(京都大学大学院医学研究科教授)
 鍋島 陽一(京都大学大学院医学研究科教授)
 伊藤 紳三郎(京都大学大学院工学研究科教授)
 北村 隆行(京都大学大学院工学研究科教授)
 西田 栄介(京都大学大学院生命科学研究科教授)

◆ 京都大学再生医科学研究所職員等(平成19年1月1日現在) ◆

所長(兼): 中辻 憲夫 副所長(兼): 岩田 博夫

■ 生体機能学研究部門 ■

〈細胞機能調節学分野〉

教授: 永田和宏 助教授: 細川暢子 助手: 久保田広志 講師(非常勤): 黒岩常祥, 田中啓二, 貫名信行
 技能職員: 島田道子 事務補佐員: 石田玉美 研究補助員: 中川澄江, 金森和美, 門田真奈
 大学院生: 森戸大介, 中村純治, 長澤孝治, 石田義人, 平山尚志郎, 新木和孝, 石川善弘, 里本健輔, 杉浦仁美,
 萩原誠智, 真砂有作, 北村 朗, 潮田 亮
 博士研究員: 本間貴之, 寶関 淳

〈生体微細構造学分野〉

講師: 平芳一法 大学院生: 法邑賢一

〈生体機能調節学分野〉

教授: 坂口志文 助手: 野村尚史 講師(非常勤): 坂口教子, 清水 淳
 教務補佐員: 山本恵津子 事務補佐員: 古村雅代
 大学院生: 鬼頭昭彦, 橋本 求, 大西 康, 島 友子, 前田伸治, 瓜生英尚, 吉岡弓子, 岸 歩美
 研究員(COE): 山口智之 研究員: Kajsia Wing, 廣田圭司, 杉本直志 講師(研究機関研究員): 小野昌弘
 日本学術振興会外国人特別研究員: 宮良 亮 研究生: 寺平 晋

〈生体システム制御学分野〉

教授: 長澤丘司 研究員(COE): 細野 晃 事務補佐員: 佐藤瑞穂 研究員(科学研究): 杉山立樹, 尾松芳樹
 大学院生: 小原洋志, 野田麻実子, 梶原 茜(休学中), 藤本七恵

〈生体再建学分野(国内客員)〉

助教授: 清木(古谷)誠, 若山照彦

■ 生体組織工学研究部門 ■

〈生体分子設計学分野〉

教授: 開 祐司 助教授: 宿南知佐 助手: 近藤俊哉 講師(非常勤): 近藤 淳, 鄭 雄一, 小守壽文, 今井賢治
 教務補佐員: 滝本 晶 事務補佐員: 久保友紀恵 外国人共同研究者: 郭 水龍 技術補佐員: 杉山弘美
 大学院生: 伊東良太, 北川 章(休学中), 吉本由紀, 毛利公美 研究員: 西崎有利子 研修員: 三浦重徳

〈生体材料学分野〉

教授: 田畑泰彦 助手: 山本雅哉 日本学術振興会特別研究員: 北郷明成

事務補佐員：馬場恭子

研修員：井上幸子 大学院生：木村 祐，城潤一郎，劉 健，高本智紹，金谷 勲，今村正明，小川源太郎，岡空高広，竹越 稜，宮崎伸彦，小川敏弘，永根健太郎，林 直樹，吉田雅貴

受託研究員：渡辺耕平，雜賀 健，高橋一裕，園田 浩，谷田泰常 研究員(COE)：上田寛樹

研究生：高岡良平 日本學術振興会外国人特別研究員：Devang THAKOR

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 助教授：加藤功一 講師(非常勤)：宇山良公

事務補佐員：鈴木義子

大学院生：中路 正，小野大三郎，金田成弘，宮崎寛子，山口歌奈子，戸谷貴彦，川井田真一，乾 靖，平岡真希子

教務補佐員：有馬祐介，藤本裕之 産学官連携研究員：佐藤秀樹，井上祐貴，Njatawidjaja Ellyana 研修員：藤田 聡
民間等共同研究員：戸田満秋，滝口裕実，小田基浩 技術補佐員：中井勇介 研究員：藤本沙織

日本學術振興会外国人特別研究員：Carlos Alberto Agudelo

〈生物物性学分野(国内客員)〉

教授：山本伸子

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 NEDO 講師：川瀬栄八郎 助手：中馬新一郎 研究員(NEDO)：長谷川光一

産学官連携研究員：庄司昌伸 研究員(科学研究)：喜多村晃一 教務補佐員：森部江美子，久世敦美

技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ

大学院生：細川美穂子，田中 敬 民間等共同研究員：多田政子

〈再生誘導研究分野〉

教授：山中伸弥 助手：中川誠人 研究員(科学研究)(特任助手)：高橋和利 CREST 技術員：一阪朋子，成田 恵

産学官連携研究員：小柳三千代 日本學術振興会特別研究員：沖田圭介

日本學術振興会外国人特別研究員：Marc P. A. Lewitzky

CREST 事務員：加藤里絵

大学院生：小田泰昭，青井貴之，今村公紀，坪岡則子，平野孝明，三浦恭子，岩淵久美子，中村友紀，田邊剛士

国費留学生：ホン・ヒョンジョン

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助手：栗崎知浩 講師(非常勤)：見学美根子 研究員(COE)：飯田敦夫

講師(研究機関研究員)：越前谷美智子

教務補佐員：倉澤祥子 事務補佐員：志賀明香 技術補佐員：黒田信子

大学院生：入江直樹，湯本法弘，小松紘司，横関智一，王霄月，川本敦司，八藤由之，木村剛隆，坂口和弥

〈再生免疫学分野〉

助教授：喜納辰夫 助手：藤本真慈

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

(欠員中)

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 助手：青山朋樹 民間等共同研究員：小林 明

事務補佐員：安田尚代

大学院生：柴田弘太郎，嶋靖子，吹上謙一，光野芳樹，大塚聖視，布留守敏，山田栄治，伊藤錦哉，金 永輝，梶田洋一郎

〈器官形成応用分野〉

助教授：角昭一郎 講師(非常勤)：砂村真琴，日裏彰人，小林直哉 講師(研究機関研究員)：漆 智
事務補佐員：菊地裕子
大学院生：柳井伍一 研究生：星野順一

〈臓器再建応用分野〉

助教授：中村達雄 講師(非常勤)：早川克己，稲田有史，堀 義生，茂野啓示
事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：岡西泰永
大学院生：中田 颯，中島 晋，市原理司，荒木政人，佐藤寿彦，小林丈士
研究生：糸井真一，諸井奈美，井上勝也
研修員：松野智宣，井上祐利

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長(兼)：坂口志文 副施設長(兼)：戸口田淳也
助教授：近藤 玄 技術職員：出口央士
技能補佐員：古卿智英，人見博子，石丸英典，細田 勝，西山尚之，柴田 豊，山崎幸子，渡辺知子，浅野真由美，田中正行，
大川実穂，木本 実，藤田 章
JST：谷 妙子(研究補助員) 技術補佐員：折橋 郁

■ 附属幹細胞医学研究センター ■

センター長(兼)：中辻憲夫

〈霊長類胚性幹細胞研究領域〉

助教授：末盛博文 産学官連携助手：角 智行 研究員(NEDO)：宮崎隆道
民間等共同研究員：山内香織 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：石井隆道，安田晋也，
安達啓子，福光 剣，恒吉法尋

〈幹細胞分化制御研究領域〉

助教授：山下 潤 研究員：平岡美奈 研究員(派遣研究員)：柳 堅徳
技術補佐員：井上恵美 大学院生：星野託広，檜崎元太，魚崎英毅，山水康平，藤原正隆，顔 培美
教務補佐員：沖本きよみ 研究員(NEDO)：蟹江美奈

〈幹細胞加工研究領域〉

助教授：多田 高 事務補佐員：福地恵美
大学院生：黒田貴雄，松村寛行，山口新平，平野邦生，鬼塚文子

〈細胞プロセッシング研究領域(客員)〉

教授：高橋恒夫 助教授：楠田美保
研究員(特別教育研究)(CPC 主任)：高田 圭

〈再プログラム化研究領域(客員)〉

教授：鳥居隆三

■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：堤 定美

〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 特任助手：鈴木健一，藤原敬宏
大学院生：石橋宗典，高橋英樹，西村博仁，梅村康浩，岡田拓也，木村秀貴

日本学術振興会特別研究員：中田千枝子，村越秀治

民間等共同研究員：岩沢こころ，本田郁子，笠井倫志，坂本晋子，Damien Hall

JST(ICORP)技術員：坪井久恵，近藤順子，八原雅子，吉田聡子，土方博子，Suven Rasidi

教務補佐員：大山三菜子，北川貴子

〈シミュレーション医工学研究領域〉

教授：堤 定美 助教授：玄 丞然 講師(非常勤)：南部敏之，茂木伸夫，菅原明喜，中島直喜

教務補佐員：東 高志 事務補佐員：上村幸代，小柴里美

大学院生：丘 進卿，金 学嬉，曹 漢姫，李 英哲，中井隆介，蔡 毅，山本 宏，裴 庭胤，原田雅樹，山本貴士，
島田義孝，福岡 敦，手嶋晋太郎，猪熊宏幹

日本学術振興会外国人特別研究員：韓 東旭 研究員(NEDO)：姜 有峯

研究生：土肥健二，井汲憲治，城眞理子，田中正利

研修員：中村昌幸 教務補佐員：山口武志 受託研究員：三島昭宏 産学官連携研究員(特任助手)：松村和明

民間等共同研究員：須賀井一，金宗 潤，近田英一，濱本 仁

〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助手：都賀谷紀宏

事務補佐員：上村幸代

〈再生医工学研究領域(外国人客員)〉

(欠員中)

■ 寄附研究部門 ■

〈組織分化制御学研究部門〉

助教授(特任)：平井洋平 助手(特任)：青野真也

民間等共同研究員：山本祥也，武田裕嗣，平井京子 事務補佐員：奥田由美子

テクニカルアシスタント：山崎恭子，奥川洋司 私学研修員：孫 樹秋

■ 技術部 ■

技術専門員：松下隆壽 技術専門職員：小岸久美子

■ 事務部 ■

事務長：山崎猛司

総務掛長：岡田幸美 主任：島本 博(休職)，坂 令子 事務補佐員：戸倉理恵子，小山みさを 派遣職員：西田陽子

経営企画掛長：北野和男 事務職員：奥村和彦，長谷川圭一朗 事務補佐員：緒方康子 派遣職員：鎌田亜希子

管理運用掛長：福島慎吉 事務職員：三浦真帆，岐田明海 事務補佐員：中瀬安子，戸嶋素子 派遣職員：太田裕美

■ ナノメディシン融合教育ユニット ■

科学技術振興助手：外波弘之，寺村裕治

教務補佐員：井上加代子

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University 2006

京都大学再生医科学研究所年報 2006

2007 年 3 月 18 日 印刷 2007 年 3 月 25 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 (株)北斗プリント社
